Zur Kenntnis der Fumarsäure hydrierenden Enzyme

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

einer

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Alfred Roedig

aus Köln a./Rhein.

1939

Buchdruckerei Richard Mayr, Würzburg.

Referent:

Professor Dr. F. G. Fischer.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

MEINEN LIEBEN ELTERN!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543516_0036

Inhaltsübersicht.

Seite

Einleitung 1

I. Teil: Zusammenhang zwischenFumarathydrase und Flavinenzym . . . 2

A. Kennzeichnung des Problems 2

B. Trennung von Fumarathydrase und gelbem Ferment 3
1. Einwirkung organischer Lösungsmittel 3
2. Fällungs- und Adsorptionsmethoden 4
a) Fällungen mit Ammoniumsulfat 4
b) Adsorptionen an Aluminiumhydroxyd C_γ 4
3. Beeinflussung durch Dialyse 6
4. Darstellung von Fumarathydrase freiem Flavinenzym 7
5. Elektrophoretische Trennung 8
a) Experimentelle Möglichkeiten 8
b) Ergebnisse der Elektrophoreseversuche 9

C. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen 10

II. Teil: Aktivator und Coferment der Fumarathhydrase 11

A. Kennzeichnung des Problems 11

B. Die Funktion des Lactoflavins 11
1. Wirksamkeitssteigerung inaktivierter Fermentlösungen 11
2. Nachweis einer allgemeinen Aktivierung 12
3. Deutung der Aktivierungserscheinungen 13

C. Spaltung und Resynthese 14
1. Theoretische Vorbemerkungen 14
2. Nachweis der prostethischen Gruppe 15
3. Aktivierungsgröße und Cofermentkonzentration 16
4. Charakterisierung des Gleichgewichtes 17
5. Wirkungsstärke des Cofermentes 18

C. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen 18

III. Teil: Zusammenhang zwischen Fumarathydrase und Succinodehydrase . 21

A. Kennzeichnung des Problems 21

B. Die Fumaratwirkung der Succinodehydrase 22

C. Tierische Gewebe 23
1. Frische Gewebe und Preßsäfte 23
2. Trockengewebe und Macerationssäfte 24

Seite

D. Hefe und Hefepraparate 25
1. Lebende und plasmolysierte Hefe 26
2. Trockenhefe und Macerationssäfte 27
3. Gereinigte Fermentlösungen 28

E. Sonstige pflanzliche Zellen 29

F. Flavine als Wasserstoffdonatoren der Succinodehydrase 29

G. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen 30

Experimentelles.

A. Methodik der Wirksamkeitsbestimmung 34
1. Bestimmung der Fumarathydrasewirksamkeit 34
2. Bestimmung der Flavinenzymwirksamkeit 35
3. Bestimmung der Succinodehydrasewirksamkeit 38

B. Versuche zur Trennung von Fumarathydrase und Flavinenzym . . . 38
1. Gewinnung der Ausgangsmaterialien und Hilfsmittel 38
2. Chloroformbehandlung 40
3. Essigesterbehandlung 40
4 Fällungsversuche mit Ammoniumsulfat 41
a) Ausführung der Fällungen 41
b) Fällungsbedingungen der Fumarathydrase 41
5. Adsorptionsversuche mit Aluminiumhydroxyd C_γ 42
6. Die Bedingungen der Dialyse 44
a) Dialyse gegen stehendes dest. Wasser 44
b) Dialyse gegen fließendes dest. Wasser 44
c) die Elektrodialyse 45
7. Vorschrift zur Darstellung von Fumarathydrase freiem gelbem Ferment 45
8. Elektrophoreseversuche 45
a) Apparatur und Versuchsanordnung 45
b) Vorversuche über p H Beständigkeit 47
c) Zusammenstellung der Versuchsdaten und Ergebnisse 47

C. Versuche über Aktivator und Coferment der Fumarathydrase . . . 52
1. Die Adsorption an Tierkohle 52
2. Versuche zur allgemeinen Lactoflavinaktivierung 53
3. Versuche mit katalytisch reduziertem Farbstoff 54
4. Hydrierung mit Dihydrolactoflavin 54
5. Spaltung durch saure Ammoniumsulfatfällung 55
a) Darstellung der Proteinkomponente 55
b) Rekombinationsversuche 55

D. Versuche zur Trennung von Fumarathydrase und Succinodehydrase . . 57
1. Versuche am tierischen Gewebe 57
a) Gewebepreßsäfte und Susppensionen 57
b) Trockenmuskel und Macerationssäfte 58
2. Versuche mit lebender und plasmolysierter Hefe 60
3. Versuche mit Trockenhefe 60
4. Versuche mit gereinigten Fermentlösungen 61
5. Versuche mit pflanzlichen Extrakten 62
6. Versuche mit Fumarathydrase freiem Flavinenzym 63

Literaturangaben 64

Die vorliegende Arbeit wurde Anfang Januar 1937 im chemischen Laboratorium der Universität Freiburg im Breisgau begonnen. Seit Oktober 1937 wurden die Versuche im chemischen Institut der Universität Würzburg fortgesetzt und Ende Januar 1939 zum Abschluß gebracht.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. F. G. Fischer, möchte ich für die wertvolle Unterstützung, die er meiner Arbeit zuteil werden ließ, herzlich danken.

EINLEITUNG.

In zahlreichen Arbeiten der letzten Jahre ist der Hauptablauf der chemischen Vorgänge der Atmung und Gärung als eine Folge Wasserstoff übertragender Teilreaktionen gekennzeichnet worden. Dabei wird die beim Abbau der Nährstoffe verfügbar werdende Energie stufenweise, in kleinen Quantitäten umgesetzt, so daß sie zur Synthese körpereigener Stoffe nutzbar gemacht werden kann. Hydrierungen von Äthylendoppelbindungen, Carbonyl- und Iminogruppen sind als Aufbaureaktionen dieser Art an die dehydrierenden Abbauvorgänge gekoppelt.

Die Übertragung von Wasserstoff auf ungesättigte Alkohole, Aldehyde und Ketone durch gärende Hefe [1]), bildete den Anfang einer Reihe von Untersuchungen, in denen, über das rein Präparative hinausgehend, eine Kennzeichnung der an „biochemischen Hydrierungen" beteiligten Enzyme angestrebt wurde [2]). Art und Wirkung der „Äthylenhydrasen" und ihre Verknüpfung mit anderen Fermentsystemen zu studieren, erschien angesichts der Fähigkeit dieser Wasserstoffüberträger, synthetische Vorgänge lebender Zellen zu katalysieren, als eine Aufgabe von vielseitiger biologischer Bedeutung. Vor allen übrigen, einer fermentativen Absättigung zugänglichen Äthylenkörpern, rückte aber namentlich die Fumarsäure in den Mittelpunkt des Interesses. Fumarsäure wird sogar von gereinigten Enzymlösungen, welche die Fähigkeit zur Hydrierung der anderen ungesättigten Verbindungen mehr oder weniger verloren haben, mit hoher Geschwindigkeit in Bernsteinsäure umgewandelt. Ein Ferment, welches diese Reaktion, von der Succinodehydrase des Muskels verschieden, irreversibel katalysiert, wurde aus Hefe isoliert und als „Fumarathydrase" bezeichnet [3]).

$$D\,H_2 + \text{Fumarsäure} \xrightarrow{\text{Fumarathydrase}} D + \text{Bernsteinsäure.}$$

Die physiologische Bedeutung dieses Fermentes wird durch zahlreiche Beobachtungen hervorgehoben, die für eine besondere lebenswichtige Funktion der Fumarsäure und ihrer hydrierenden Enzyme im Rahmen der mit der Atmung einhergehenden Wasserstoffverschiebungen sprechen [4]).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit werden nun Versuche mitgeteilt über die Reinigung der Fumarathydrase und ihre Abtrennung von anderen Enzymwirkungen. Im zweiten Teil folgt eine nähere Charakterisierung des Cofermentes und der beteiligten niedermolekularen Donatoren. Der dritte Teil befaßt sich endlich mit der Verbreitung und der biologischen Bedeutung dieses Wasserstoffüberträgers.

I. Teil.

Zusammenhang zwischen Fumarathydrase und Flavinenzym.

A. Kennzeichnung des Problems.

In einer früheren Mitteilung über „biochemische Hydrierungen“ [3]) wurde bereits eine nähere Kennzeichnung der Fumarathydrase begonnen, die den nahen Zusammenhang dieses Enzyms mit dem einzigen bis dahin bekannten Flavoprotein, dem gelben Ferment Warburgs sehr wahrscheinlich machte. Lösungen, die Fumarathydrase in wechselndem Reinheitsgrad enthielten, zeigten stets einen hohen Gehalt an gelbem Ferment (Flavinenzym). Da auch nach der Behandlung mit Fällungs- und Adsorptionsmitteln keinerlei Abtrennung erfolgte, lag zunächst der Gedanke an eine Identität der beiden Enzyme nahe. Die katalytischen Fähigkeiten des gelben Fermentes sind jedoch von denen der Fumarathydrase durchaus verschieden. Nach O. Warburg [5]) ist die spezifische Funktion des Flavinenzyms die eines Wasserstoffüberträgers in dem System:

$$\text{Substrate} \rightarrow \begin{matrix}\text{Dehydrasen} \\ \text{Codehydrasen}\end{matrix} + \rightarrow \text{gelbes Ferment} \rightarrow \begin{matrix}\nearrow \\ \searrow\end{matrix} \begin{matrix}\text{Sauerstoff} \\ \text{oder} \\ \text{Methylenblau}\end{matrix}$$

Die verschiedenartigen Wirkungen, in Bezug auf den Wasserstoffempfänger, ein und demselben Ferment zuzuschreiben, würde aber im Widerspruch stehen zum allgemein gültigen Spezifitätsbegriff der Fermentchemie.

Der Leitgedanke weiterer Untersuchungen war daher der, Fumarathydrase- und Flavinenzymwirksamkeit nach Möglichkeit von einander abzutrennen und somit verschiedenen Fermenten zuzuweisen oder die Kopplung dieser beiden Wirkungen und damit ihre fermentative Zusammengehörigkeit aufzuzeigen. Die Entscheidung dieser Frage kann geführt werden, indem man Präparate wechselnder Herkunft und Reinheit quantitativ auf die beiden fermentativen Fähigkeiten hin vergleicht. Als Ausgangsmaterial und zum Vergleich diente dabei eine Lösung des sog. gelben Rohfermentes [5]), die als Fumarathydrase und als Flavinenzym in gleicher Weise hoch wirksam ist. Fumarathydrase- und Flavinenzymgehalt dieses Präparates wurden willkürlich als äquivalent angenommen und für eine bestimmte Menge einer Lösung 1 : 10 (1 g

Rohferment in 10 ccm Wasser) als eine Fumarathydrase- bzw. eine Flavinenzymeinheit festgelegt. (Nähere Angaben siehe Seite 36.)

Die Wirksamkeit der Fumarathydrase wurde im Farbstoffversuch mit Leukomethylenviolett [3]) bestimmt, die des gelben Fermentes im System der Hexosephosphatdehydrierung mittels Sauerstoff oder Methylenblau [5]).

B. Trennung von Fumarathydrase und gelbem Ferment.

In der Enzymchemie sind zur Reinigung und Trennung von Fermenten im allgemeinen folgende Grundmethoden üblich:

1. Fällen mit organischen Lösungsmitteln oder Salzlösungen,
2. Adsorptionsverfahren und
3. neuerdings auch die Elektrophorese. Die Anwendung dieser Methoden auf das vorliegende Problem bildet den ersten Teil dieser Arbeit.

1. Einwirkung organischer Lösungsmittel.

Es ist bereits früher betont worden, daß eine Umfällung von Rohfermentlösungen mit organischen Lösungsmitteln wie Aceton und Methanol zu erheblichen Wirksamkeitsverlusten der Fumarathydrase führt [3]). Auch eine Behandlung der Fermentlösungen mit Chloroform, die nach Angaben Warburgs große Mengen unwirksamen Eiweißes ohne wesentliche Schädigung des gelben Fermentes entfernt, setzt die Aktivität der Fumarathydrase stark herab. Ähnliche Wirkungen sind ferner in Anwesenheit von Essigester zu beobachten. Frisch dargestellte Essigesterautolysate aus lebender Hefe zeigen zwar eine Fumarathydrasewirksamkeit, die bezogen auf das Trockengewicht der Hefe etwa doppelt so groß ist wie die des üblichen Macerationssaftes. Sie verlieren diese Aktivität aber beim Stehen in kurzer Zeit. Benutzt man daher Essigesterautolysate an Stelle von Macerationssäften als Ausgangsmaterial des gelben Rohfermentes, so lassen sich Präparate gewinnen, die eine starke Verschiebung des Wirksamkeitsverhältnisses Flavinenzym/Fumarathydrase zu Gunsten des ersteren zeigen. Nach Angaben von E. Adler und Mitarbeitern [6]) soll bei einer derartigen Autolyse das Flavinenzym größtenteils gespalten werden. In unseren Versuchen wurde es aber ohne wesentliche Schädigung und weitgehend von der empfindlicheren Fumarathydrase befreit, mit guter Ausbeute isoliert. So zeigte das beste der nach dieser Methode erhaltenen Präparate ein Wirksamkeitsverhältnis von nahezu 30 : 1 zu Gunsten des gelben Fermentes, wobei dessen Aktivität nur wenig hinter derjenigen des gewöhnlichen Rohfermentes zurückblieb. (Tabelle 3).

2. Fällungs- und Adsorptionsmethoden.

a) Fällungen mit Ammoniumsulfat.

Fällungsverfahren sind, da alle organischen Lösungsmittel die Fumarathydrase in reinerem Zustand leicht zerstören, zur Reinigung dieses Fermentes nur sehr begrenzt anwendbar. Lediglich die Methode des Aussalzens mit Ammoniumsulfat kann ohne Verluste herangezogen werden. Sie führt, wie in früheren Arbeiten gezeigt wurde [3]), zwar zu einer Anreicherung der Fumarathydrase, nicht aber zu einer Abtrennung vom gelben Ferment. Das Verhalten Ammoniumsulfat gegenüber ist naturgemäß stark abhängig vom Reinheitsgrad der Fermentlösungen, sowie von ihrem pH und sonstigen Versuchsbedingungen. Die Fällungsgrenzen für Ammoniumsulfat sind daher beim Rohferment, den gereinigten Lösungen gegenüber, stark nach oben verschoben. H. Theorell macht für diese Verschiebung den Gehalt der rohen Präparate an Polysacchariden verantwortlich, die bei der Adsorption entfernt werden [7]). Die Fällungsverhältnisse der Fumarathydrase zeigen im übrigen eine so weitgehende Übereinstimmung mit den von Theorell für das gelbe Ferment gemachten Angaben, daß eine Trennung der Fermente durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung aussichtslos erscheint. Lediglich die größere Empfindlichkeit der Fumarathydrase sauren Ammoniumsulfatlösungen gegenüber und damit die Verschiebung der optimalen Fällungsbedingungen ins schwach alkalische Gebiet hinüber, stellt einen abweichenden, präparativ aber bedeutungslosen Befund dar. Ammoniumsulfatfällungen bei pH 5,2 und 66% Sättigung die für das Flavinenzym günstigsten Bedingungen, führen, besonders in gereinigten Lösungen, zu starken Verlusten der Fumarathydrase. Lediglich bei schwach alkalischem pH können Ammoniumsulfatfällungen unter Erhaltung der gesamten Wirksamkeit in Niederschlag und Restlösung durchgeführt werden. Gelbes Ferment erweist sich hingegen innerhalb des pH Bereiches von 4, 6 bis 9 dem Fällungsmittel gegenüber als vollkommen beständig. Der aufgezeigte Unterschied der beiden Fermente ist sehr bedeutungsvoll, verrät er doch, wie spätere Versuche gezeigt haben, eine leichtere Dissoziierbarkeit der Wirkungsgruppe der Fumarathydrase.

b) Adsorptionen an Aluminiumhydroxyd Cγ.

Zur Adsorption der Fumarathydrase eignen sich am besten diejenigen Adsorptionsmittel, die auch als gute Adsorbentien für gelbes Ferment wirken [8]), vor allem das nach Willstätter und Kraut erhältliche Aluminiumhydroxyd Cγ [9]). Stoffe, die gelbes Ferment nur wenig adsorbieren, wie z. B. Kaolin, adsorbieren auch keine Fumarathydrase. Frankonit zeigte eine mittlere Adsorptionsfähigkeit für Fumarathydrase, wie

sie auch von Weygand [8]) für das Flavinenzym angegeben wird. Durch Granosil wird Fumarathydrase hingegen aus gereinigten Lösungen zu einem größeren Prozentsatz entfernt als das gelbe Ferment. Da es aber nicht möglich ist das Ferment aus dem Adsorbens wieder zu eluieren, handelt es sich hier wahrscheinlich garnicht um eine einfache Absorption, sondern um tiefer greifende Veränderungen am Fermentmolekül (Abspaltung einer Wirkungsgruppe?).

Nur Aluminiumhydroxyd Cγ zeigte einen brauchbaren Unterschied in seiner Adsorptionsfähigkeit den beiden Fermenten gegenüber. Sowohl aus Rohfermentlösungen wie auch aus Macerationssäften kann Fumarathydrase von diesem Adsorptionsmittel aufgenommen und in guter Ausbeute (85—90%) wieder eluiert werden. Über Adsorptionen des Rohfermentes an Cγ lagen bereits Versuche vor, einerseits von F. G. Fischer und H. Eysenbach [3]), sowie von W. Robertson [10]) für die Fumarahthydrase, andererseits von F. Weygand und H. Stocker über die Reindarstellung des gelben Fermentes [8]).

Es war zunächst von großem Interesse nachzuprüfen, ob das Weygand'sche Verfahren, das zu 100%tig reinem gelbem Ferment führen sollte, ein Präparat liefert, das keinerlei Fumarathydrierende Wirkung mehr zeigt (Versuch 1, Seite 42). Bei den weiteren Adsorptionsverchen wurde dann umgekehrt eine Verschiebung des Wirksamkeitsverhältnisses zu Gunsten der Fumarathydrase angestrebt. Der Erfolg war, angesicht der geringen Stabilität dieses Fermentes, allerdings begrenzt. Die Grundlage dieser Versuche bildeten zwei Beobachtungen: 1. daß die Fumarathydrase aus schwach phosphathaltiger Lösung schwerer adsorbiert wird als das gelbe Ferment (Versuch 2, Seite 42) und 2. daß sie mittels ihres Akzeptors, Lösungen von Kaliumfumarat leichter eluiert werden kann (Versuch 3, Seite 43).

Die nach der Methode von Weygand dargestellte Lösung von „reinem" Flavinenzym (Versuch 1) war stark gelb gefärbt und enthielt in einer Ausbeute von 4% noch 0.21 Fumarathydraseeinheiten (Tabelle 4). In Übereinstimmung damit zeigte auch ein von Weygand überlassenes Präparat von reinem gelben Ferment noch eine beträchtliche Fumarathydrasewirksamkeit. Die Methode führt zu Lösungen, die nicht als rein im Sinne fermentativer Einheitlichkeit angesehen werden können, wohl aber von der Hauptmenge der Fumarathydrase befreit sind. Das Ergebnis beruht weniger auf einer Abtrennung dieses Fermentes unter Erhaltung seiner Wirksamkeit, sondern hauptsächlich auf seiner Zerstörung, die namentlich bei den zahlreichen Dialysen und mehrmaligen Umfällungen mit Ammoniumsulfat in schwach saurem Medium eintritt.

Bei der Anwendung des zweiten Prinzips (Versuch 2), Adsorption aus schwach phosphathaltiger Lösung, gelang es erstmalig ein Präparat zu erhalten, in dem sich die Fumarathydrase dem gelben Ferment

gegenüber auf das Dreifache angereichert vorfand. Die geringe Verschiebung wurde erreicht durch Adsorption der schwach phosphathaltigen Lösung an eine kleine Menge Cγ. Bei weiterer Behandlung mit Cγ bleibt die Adsorption unvollständig und führt dann zu einer Verschlechterung des Wirksamkeitsverhältnisses in der Restlösung. Zur vollständigen Adsorption müßte die Lösung durch eine langwierige Dialyse vom Phosphat restlos befreit werden. Bei der Dialyse wird die Fumarathydrase aber so stark geschädigt, daß der bis dahin erzielte Erfolg wieder aufgehoben wird. Versuche, das Verhältnis 3 : 1 durch Ammoniumsulfatfällungen weiterhin zu verbessern, waren teilweise erfolgreich, aber nicht mit Sicherheit reproduzierbar. Die Befreiung der Fumarathydrase vom gelben Ferment gelingt also nur in sehr beschränktem Maße. Der Versuch zeigt aber, wie man umgekehrt zu einem ziemlich reinen und praktisch Fumarathydrase freien gelben Ferment gelangen kann. Eluieren der Cγ-Rückstände mit Phosphatlösungen, mehrmaligne Umfällungen mit Ammoniumsulfat im sauren pH Gebiet, scharfes Dialysieren und längeres Stehenlassen der Lösungen, waren die dafür maßgebenden experimentellen Bedingungen. Das Trockengewicht des so erhaltenen Präparates betrug 5,3 mgr für eine Einheit. Dem Rohferment gegenüber (83 mgr/ccm) war also das gelbe Ferment hier auf etwa das 16fache angereichert. (Tabelle 5).

Die besten Ergebnisse wurden schließlich erzielt bei der Anwendung des dritten Prinzips, der Elution mit Lösungen von Kaliumfumarat. (Versuch 3, Seite 43). Man erhielt dabei nach mehrfachen Adsorptionen und Elutionen bei milden Dialysebedingungen mit 17% Ausbeute ein Präparat, das 6mal mehr Fumarathydrase als gelbes Ferment enthielt. Eine Verbesserung dieses Verhältnisses ist aber nicht mehr möglich. Dialysiert man die Lösung während 24 Stunden gegen fließendes destilliertes Wasser, was, da das Ferment aus Ammoniumsulfat haltiger Lösung nicht adsorbiert wird, unbedingt nötig ist, so sinkt die Fumarathydrasewirksamkeit bis auf das Verhältnis 1 : 1 und weiter zurück. Auch eine mehrmalige Umfällung der Lösung mit Ammoniumsulfat bei pH 9 führt, der größeren Unbeständigkeit der Fumarathydrase wegen, nicht zu einer Verbesserung, sondern sogar zu ungünstigeren Ergebnissen.

3. Beeinflussung durch Dialyse.

Die Dialyse mußte nach jeder Adsorption und Elution zur Entfernung anorganischer Salze eingeschaltet werden, um eine Wiederholung des Reinigungsschrittes zu ermöglichen. Sie war in den meisten Fällen von außerordentlich großen Verlusten an Fumarathydrase begleitet. Die Empfindlichkeit des Fermentes der Dialyse gegenüber begrenzt den Anwendungsbereich der Adsorptionsmethoden grundsätzlich. Sie wird durch den Reinheitsgrad der Lösungen sowie durch die ge-

wählten Versuchsbedingungen wesentlich beeinflußt und steht im scharfen Gegensatz zu der ausgesprochenen Dialysebeständigkeit des gelben Fermentes. Die Dialyse gegen stehendes destilliertes Wasser verläuft beim Rohferment bis zu einer Dauer von 48 Stunden ohne jeden Wirksamkeitsverlust, bei reineren Präparaten tritt jedoch eine Schädigung auf, deren Ausmaß mit zunehmendem Reinheitsgrad wächst. Führt man die Dialyse während 24 Stunden gegen fließendes destilliertes Wasser durch, so geht die Fumarathydrasewirksamkeit namentlich von stark verdünnten Lösungen reinerer Präparate bis auf einen Restbetrag von höchstens 5—10% verloren. Die Wirksamkeit der dialysierten Lösung nimmt nicht nur während der Dialyse, sondern auch nachher beim Aufbewahren bei 0° ständig ab. Nach weiteren 24 Stunden sind die Präparate völlig inaktiv. Führt man die Dialyse gegen fließendes Wasser genügend lange, etwa 2 bis 3 Tage durch, so gelingt es sogar die Fumarathydrase in Rohfermentlösungen praktisch vollständig zu zerstören. Die Aktivität des gelben Fermentes bleibt dabei trotz starker Niederschlagsbildung unverändert erhalten. Das Wirksamkeitsverhältnis betrug in zwei Versuchen 35 : 1 bzw. 55 : 1 zu Gunsten des Flavinenzyms. Dialysiert man nicht gegen destilliertes Wasser, sondern gegen m/200 Phosphatpufferlösung vom p_H 7, so wird nach 4tägiger Dialyse ebenfalls eine sehr starke Verminderung der Aktivität des Rohfermentes erreicht, und zwar bis auf etwa 1/20 des ursprünglichen Wertes, ohne daß eine nennenswerte Trübung auftritt. Zwischen der Größe der Dialyseinaktivierung und der Menge der dabei auftretenden Niederschläge besteht demnach kein direkter Zusammenhang. Die Zerstörung der Fumarathydrase durch Dialyse beruht nur teilweise auf einer Denaturierung von Eiweiß. Ihre Ursache dürfte hauptsächlich in der Entfernung eines notwendigen dialysierbaren Cofermentes zu suchen sein.

4. Darstellung von Fumarathydrase freiem Flavinzym.

Unter Zuhilfenahme der bisher gesammelten Erfahrungen, konnte nunmehr auch eine Methode angegeben werden, die mit Sicherheit zu einem zwar nicht besonders reinen, aber absolut Fumarathydrasefreien „gelben" Ferment" führt. Diese Methode verwendet eine Kombination mehrerer Fumarathydrase schädlicher Einflüsse, Essigesterbehandlung, schwach saure Ammoniumsulfatfällungen und langdauernde scharfe Dialysen. Das Präparat enthält gelbes Ferment in gleicher Aktivität wie das übliche Rohferment mit 40%tiger Ausbeute. Das Verhältnis Flavinenzym/Fumarathydrase ist größer als 500 : 1. Die Darstellung dieser Lösung ist im Zusammenhang mit späteren Versuchen über das Zusammenwirken der hydrierenden Enzyme von großer Wichtigkeit gewesen.

5. Elektrophoretische Trennung.

a) Experimentelle Möglichkeiten.

Im vorhergehenden ist gezeigt worden, daß die gewöhnlichen Trennungsmethoden von Fermenten nur in sehr beschränktem Maße zur Reinigung der Fumarathydrase herangezogen werden können. Voraussetzung für das Gelingen weiterer Reinigungsversuche war vor allem die unbedingte Vermeidung jeder Dialyse. In neuerer Zeit hat sich nun zur Trennung und Reinheitsprüfung verschiedener Fermente die Elektrophorese als eine gut brauchbare Methode erwiesen, wie von H. Theorell am gelben Ferment [7]) bzw. Cytochrom c [11]) und von O. Meyerhoff und W. Möhle am Enzymsystem des Kohlehydratabbaus [12]) gezeigt worden ist. Das Verfahren gab ferner eine Möglichkeit die uneinheitliche Natur des kristallisierten Pepsins exakt nachzuweisen, da unwirksame Fraktionen vom Ferment getrennt werden konnten [13]) [14]). Es bestand daher die berechtigte Hoffnung mit der Anwendung dieser Methode auch das Problem der Fumarathydrase seiner Lösung näher zu bringen, zumal man sich, da das Ferment dauernd in Pufferlösungen gehalten wird, kaum einen schonenderen Eingriff vorstellen kann. Die Elektrophorese als Trennungsoperation von Eiweißkörpern muß zum Ziele führen, wenn sich die im elektrischen Felde wandernden Teilchen in der Größe ihrer Ladung, oder bei gleicher Ladung zum mindesten in ihrem Reibungswiderstand dem Lösungsmittel gegenüber unterscheiden. Da die elektrische Ladung von Kolloiden nach Größe und Vorzeichen durch das p_H der Lösung variiert werden kann, bleibt theoretisch nur ein Fall übrig, bei dem eine Trennung unmöglich erscheint, nämlich, wenn beide Enzyme im isoelektrischen Punkt vollkommen übereinstimmen, und bei jedem p_H stets in der gleichen Richtung und gleich schnell wandern. Besteht im isoelektrischen Punkt zweier Eiweißkörper aber ein Unterschied von nur 0,05 p_H Einheiten, so ist nach H. Theorell [15]) zu erwarten, daß die Wanderungsgeschwindigkeit des einen Kolloids bereits doppelt so groß ist wie die des anderen. Durch eine langdauernde Kataphorese in der Nähe des isoelektrischen Punktes bei p_H 5,2 hat dieser Forscher die Einheitlichkeit seines reinen gelben Fermentes zu beweisen versucht. Er fand eine sehr schwache kathodische Wanderung, bei der im allgemeinen Fermentwirksamkeit und Stickstoffgehalt Parallelität zeigten und folgerte daraus, daß das Präparat kein Eiweiß von anderem isoelektrischem Punkt enthalten könne als dem des gelben Fermentes. Trotzdem konnte von W. Robertson ein beträchtlicher Gehalt an Fumarathydrase in dem von Theorell selbst überlassenen Präparat nachgewiesen werden [10]). Der isoelektrische Punkt der Fumarathydrase muß also gleich oder zum mindesten außerordentlich ähnlich dem des gelben Fermentes sein. Die Wanderungsgeschwindigkeiten der beiden Enzyme werden sich demgemäß nur wenig unterscheiden. Dank

der hervorragenden Konstruktion des kleinen Theorell'schen Kataphoreseapparates [15]) konnte aber trotzdem eine weitgehende Trennung erreicht werden.

b) Ergebnisse der Elektrophoreseversuche (siehe Tabellen).

Die elektrophoretischen Versuche werden innerhalb des pH Bereiches von 5,2 bis 8,5 vorgenommen. Kataphoreseversuche bei pH 4,6, wie sie von Theorell am gelben Ferment erfolgreich durchgeführt wurden, scheiden zur Reinigung der Fumarathydrase von vorne herein aus, da unterhalb pH 5,2 starke Fermentschädigungen unvermeidlich sind. Die günstigsten Elekrophoresebedingungen sind bei schwach alkalischem pH gegeben, da dann sowohl die Wanderungsgeschwindigkeit als auch gleichzeitig die Beständigkeit der Fumarathydrase ein Optimum erreicht.

H. Theorell hat den isoelektrischen Punkt des gelben Fermentes nach verschiedenen elektrophoretischen Versuchen im pH Gebiet 5,15 bis 5,26 zu 5,25 ± 0,05 bestimmt. Von uns bei pH 5,22 und 5,24 ausgeführte Versuche ergaben außerordentlich geringe Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit der beiden Fermente, sodaß eine wesentliche Trennung bei diesem pH nicht eintrat (Versuche 1a und 1b Seite 48). Aus dem Verhältnis der von beiden Fermenten zurückgelegten Wegstrecken, ließ sich, da eine Verschiedenheit des isoelektrischen Punktes um 0,05 pH Einheiten bereits eine Verdoppelung der Wanderungsgeschwindigkeit zur Folge hat, berechnen, daß der isoelektrische Punkt der Fumarathydrase um höchstens 0,01 pH Einheiten von dem des Flavinenzyms verschieden sein kann.

Verlegt man nun die Versuche mehr in das neutrale (Versuch 2, Seite 48) oder besser noch in das alkalische Gebiet, (Versuche 3a bis c, Seite 49) so verstärken sich die Unterschiede der Wanderungsgeschwindigkeiten mehr und mehr. Fumarathydrase erweist sich beweglicher als das gelbe Ferment, und wandert im günstigsten Fall etwa 1,3 mal rascher als dieses. Bei pH 8,5 kommt es daher in den obersten Zellen des Apparates zu einer Anreicherung der Fumarathydrase auf 6 : 1 dem gelben Ferment gegenüber. Dieses Verhältnis konnte weiterhin verbessert werden durch Vergrößerung des einer Einwanderung der Fermente zur Verfügung stehenden Raumes. Bei pH 8,58 wurde so eine weitgehend gereinigte, und von Flavinenzym größtenteils freie Fumarathydraselösung erhalten. Die Anreicherung dem Rohferment gegenüber war etwa 20 fach. Das Wirksamkeitsverhältnis betrug 20 : 1 zu Gunsten der Fumarathydrase.

C. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen.

Die Untersuchungen des ersten Teiles dieser Arbeit haben die Verschiedenheit von Fumarathydrase und gelbem Ferment eindeutig bewiesen. Eine Methode zur Darstellung eines absolut Fumarathydrase freien Fravinenzyms wurde angegeben. Umgekehrt konnte durch Elektrophorese eine, in Anbetracht ihrer hohen Empfindlichkeit beachtliche Reinigung der Fumarathydrase, sowohl von gelbem Ferment, als auch von sonstigen Begleitstoffen erzielt werden.

Die leichte Zerstörbarkeit der Fumarathydrase, die bei allen Reinigungsoperationen außerordentlich störend im Wege steht, bildet ein Hauptmerkmal dieses Fermentes und einen scharfen Unterschied dem Flavinenzym gegenüber. Andererseits sprechen zahlreiche Befunde, die nahezu völlige Übereinstimmung der Redoxpotentiale [3]) und des isoelektrischen Punktes, sowie die dadurch verursachte Schwierigkeit einer Trennung durch Adsorptionen, Fällungen und Elektrophorese, zwingend für eine sehr weitgehende Ähnlichkeit dieser Körper.

In diesem Zusammenhang gewinnt eine bei der Elektrophorese auffällige Erscheinung grundsätzliche Bedeutung. Versuche im alkalischen pH Bereich führten nämlich zu einer Aufteilung der gelben, im System der Cozymasedehydrierung mit Methylenblau gemessenen, Fermentwirkung in zwei Komponenten verschiedener Wanderungsgeschwindigkeit. Das eine dieser beiden „gelben Fermente" wandert bei pH 8,5 außerordentlich langsam, das andere aber fast ebenso rasch wie die Fumarathydrase (Versuch 3a, Seite 49). Diese Beobachtung ist H. Theorell bei seinen Elektrophoreseversuchen am gelben Ferment [7]) wahrscheinlich deswegen entgangen, weil seine Versuche nicht so weit ins alkalische Gebiet hinein ausgedehnt wurden, Unterschiede der Wanderungsgeschwindigkeiten aber andererseits erst in diesem Milieu hervortreten.

Die uneinheitliche Natur des gelben Fermentes im alten Sinne Warburgs ist damit bewiesen worden. Es handelt sich hier um einen Komplex von wahrscheinlich sehr ähnlich gebauten und sehr schwer trennbaren Fermenten. Zwei dieser durch ihre Wirkung als Wasserstoffüberträger zwischen Codehydrasen und Methylenblau als „gelbe Fermente" definierten Komponenten sind durch die elektrophoretischen Versuche der vorliegenden Arbeit bereits mit Sicherheit nachgewiesen worden. Ein weiteres Glied dieser Reihe dürfte das auf Fumarsäure als Akzeptor spezifisch eingestellte „Fumarathydrase" genannte Ferment sein.

II. Teil.

Aktivator und Coferment der Fumarathydrase.

A. Kennzeichnung des Problems.

Der chemische Aufbau des von Warburg und Christian entdeckten gelben Fermentes ist durch die Arbeiten von Theorell weitgehend aufgeklärt worden. Es gelang ihm, die durch Kataphorese gereinigten Fermentpräparate als Eiweißkörper zu charakterisieren [16]), und Lactoflavinphosphorsäure aus ihnen zu isolieren [17]). Durch Spaltung und Resynthese hat er ferner bewiesen, daß die Fermentwirkung von der Bindung der Proteinkomponente an Lactoflavinphosphorsäure als niedermolekulare Wirkungsgruppe abhängig ist [7]). Im Laufe dieser Arbeit stellte es sich nun heraus, daß eine Spaltung und Rekombination der Fumarathydrasee ebenfalls möglich ist. Es war durchaus wahrscheinlich, daß diesem Ferment eine dem Flavinenzym ähnliche, zusammengesetzte Natur mit womöglich gleicher prostethischer Gruppe und nur wenig verschiedenem hochmolekularem Träger zukommt.

Das Ziel weiterer Versuche war daher, eine Spaltung der Fumarathydrase herbeizuführen, und das erhaltene Protein, wenn möglich mit einem der bereits als Wirkungsgruppen von Fermenten bekannten Cofermente zu reaktivieren. Dafür kam zunächst vor allen übrigen Lactoflavinphosphorsäure in Frage, deren Bedeutung für die Fumarathydrasewirkung bereits früher hervorgehoben wurde [3]). Von Codehydrase I und II, sowie Gluthation und anderen farblosen, niedermolekularen Überträgern war, ihren schon bekannten Eigenschaften nach, kaum eine Wirkung zu erwarten. Die endgültige Lösung des Coferment-problems der Fumarathydrase war aber erst möglich, nach der vor kurzem erfolgten Auffindung eines zweiten „gelben" Cofermentes, des Alloxazin-Adenin-dinucleotids das von Warburg entdeckt [18]) und ungefähr gleichzeitig auch von Karrer [19]) bearbeitet worden ist.

B. Die Funktion des Lactoflavins.

1. Wirksamkeitssteigerung inaktivierter Fermentlösungen.

Eine bis auf etwa 10% des ursprünglichen Wertes inaktivierte Fumarathydraselösung wurde durch Behandlung des gelben Rohfermentes mit Tierkohle erhalten. Durch Zugabe von für sich unwirksamen

Kochsäften aus Rohfermentlösungen konnte die Aktivität weitgehend wieder hergestellt werden. Der Kochsaft ließ sich im Reaktivierungsversuch bis zu einem gewissen Prozentsatz durch Lactoflavinphosphorsäure ersetzen (Tabelle 12, Seite 52). Die Steigerung der Wirksamkeit beträgt im Durchschnitt das Drei- bis Fünffache, in seltenen Fällen auch das Zehnfache vom Restwert der Proteinlösung. Die durch Lactoflavinphosphorsäure hervorgerufenen Aktivierungen bleiben aber stets weit hinter den mit Kochsaft erreichten Werten zurück. Der Flavingehalt der Kochsäfte kann an der Intensität ihrer gelben Farbe roh abgeschätzt werden. Er muß sehr viel geringer sein als der der verdünntesten Lösung von Lactoflavinphosphorsäure, die zur Verwendung kam. Nur ein extrem hoher Flavinzusatz kann eine ähnliche Steigerung bewirken, wie sie ein ziemlich verdünnter Kochsaft liefert. Bezieht man die Größe der Aktivierungen auf den Wirksamkeitswert der nicht vorbehandelten Rohfermentlösung, so zeigt sich, daß im Durchschnitt nicht mehr als 12%, bei stark inaktivierten Lösungen sogar nur 3—6% der ursprünglichen Wirksamkeit zurückerhalten werden.

Die Versuche lassen den Schluß zu, daß Lactoflavinphosphorsäure allein nur in sehr beschränktem Maße zur Reaktivierung der Fumarathydrase ausreicht, und daß der Kochsaft eine weitere nicht aus Flavin bestehende Komponente enthalten muß, die zusammen mit dem Flavin eine stärkere Aktivierung bewirkt. Es ist also unwahrscheinlich, daß die Wirkungsgruppe der Fumarathydrase mit der des alten gelben Fermentes identisch ist. Sie wird aber vielleicht teilweise durch diese ersetzbar sein. Man findet hier eine deutliche Analogie zu früheren von R. Kuhn und H. Rudy [20]) gemachten Beobachtungen. Diese Forscher haben die Proteinkomponente des „gelben Fermentes" mit einem sehr großen Überschuß an Lactoflavin (nicht Lactoflavinphosphorsäure) zu einem wirksamen Ferment kuppeln können.

2. Nachweis einer allgemeinen Aktivierung.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen stellte sich heraus, daß auch die Wirksamkeit nicht vorbehandelter Rohfermentlösungen durch Zugabe von Lactoflavinphosphorsäure auf nahezu das Doppelte gesteigert wird. Man hätte danach vermuten können, daß in den Rohfermentpräparaten überschüssige Proteinkomponente enthalten ist, die sich erst nach der Kupplung mit Lactoflavinphosphorsäure an der Fermentwirkung beteiligen kann. Zwei weitere Tatsachen sprachen jedoch gegen diese Annahme. Erstens wird eine derartige Aktivitätserhöhung nicht nur am Rohferment, sondern auch an a l l e n anderen, nach den verschiedensten Methoden gereinigten Fermentlösungen beobachtet. Sie beträgt bei reineren Lösungen sogar oftmals das Dreifache. Zweitens wird die aktivierende Wirkung überraschenderweise auch vom freien Lactoflavin und zwar in äquivalenten Konzentrationen gleich stark, aus-

geübt. Die Bindung des Lactoflavins an Phosphorsäure ist also für die Fumarathydraseaktivierung völlig belanglos. Dieser eigenartige Befund konnte auch für die durch Kohleadsorption des Flavins inaktivierten Fermentlösungen bestätigt werden.

3. Deutung der Aktivierungserscheinungen.

Die allgemeine, an sämtlichen untersuchten Fermentlösungen beobachtete Lactoflavinaktivierung der Fumarathydrase war so überraschend, daß berechtigte Zweifel an der Realität dieser Erscheinung auftauchten. Fumarathydraselösungen, besonders reinere Präaprate, werden durch Natriumhyposulfit stark geschädigt. Bei der Wirksamkeitsbestimmung in dem üblichen Test ist aber ein geringer Überschuß an Hyposulfit über die zur Reduktion des Farbstoffs gerade notwendige Menge hinaus niemals ganz zu vermeiden (siehe Seite 34). Enthalten die Ansätze Lactoflavin, so kann dieses unter Übergang in seine Leukoverbindung überschüssiges Hyposulfit beseitigen. Der ganze Effekt würde dann also auf der Vernichtung eines Fermentgiftes und nicht auf einer natürlichen Aktivierung beruhen. Die Ergebnisse wurden daher in einer Versuchsanordnung mit katalytisch reduziertem Methylenviolett unter strenger Vermeidung von Fermentschädigungen nachgeprüft. Dabei ergab sich zunächst eine geringe augenblickliche Färbung des Leukofarbstoffs, die in Versuchen mit Lactoflavin naturgemäß stärker war. Darüber hinaus fand dann die fermentative Dehydrierung des Leukofarbstoffs statt, die ebenfalls in Anwesenheit von Lactoflavin stark beschleunigt war. Die Aktivität im katalytischen Versuch entsprach der im Hyposulfitversuch, sowohl ohne wie auch mit Lactoflavinzusatz.

Die Reaktion:

$$\text{Laktoflavin} + \text{Leukofarbstoff} \longrightarrow \text{Leukolactoflavin} + \text{Farbstoff}$$

verläuft außerordentlich rasch. Dihydrolactoflavin vermag nun offenbar schneller mit der Fumarathydrase zu reagieren als Leukomethylenviolett. Die Aktivierung kommt daher zu Stande, indem sich das Lactoflavin katalytisch beschleunigend, zwischen Leukofarbstoff und Ferment einschaltet.

Man kann dies, indem man Lactoflavin durch Hyposulfit direkt reduziert, auch ohne Zugabe eines künstlichen Farbstoffs sichtbar machen, am Wiedererscheinen der gelben Lactoflavinfarbe im Thunbergrohr. Es zeigt sich, daß die Reaktion mit Dihydrolactoflavin etwa 4 mal rascher verläuft als mit Leukomethylenviolett. Auf Grund des Redoxpotentials von Lactoflavin, das R. Kuhn und P. Boulanger zu $E_0' = -0{,}185$ Volt bestimmt haben [22]), wäre aber eher das Umgekehrte zu erwarten. G. Fischer und H. Eysenbach fanden nämlich, daß die Dehydrierung von

Leukofarbstoffen mit einem Potential oberhalb —0,20 Volt nur außerordentlich langsam von Statten geht [3]). So ist z. B. zur vollständigen Reoxydation von Leukonilblau ($E_0' = -0{,}150$ Volt) mindestens die 30 fache Zeit erforderlich, die zur Umsetzung mit Leukomethylenviolett ($E_0' = -0{,}256$ Volt) gebraucht wird. Dihydrolactoflavin ist also, trotz positievren Redoxpotentials als Wasserstoffdonator der Fumarathydrase weitaus besser geeignet als Leukomethylenviolett. Bei der allgemeinen Verbreitung des Lactoflavins in Bakterien, Pfanzen und Tieren [21]) dürfte diese Beobachtung wohl von erheblicher physiologischer Bedeutung sein.

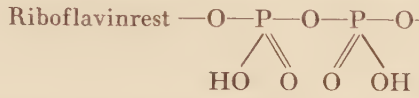
Zwischen dem hier nachgewiesenen Prinzip einer allgemeinen Aktivierung aller Fermentlösungen und den an durch Kohleadsorption inaktivierten Präparaten beobachteten höheren Wirksamkeitssteigerungen, kann, soweit sie durch Lactoflavin hervorgerufen sind, kaum ein Unterschied bestehen. Man muß bedenken, daß bei Lösungen schwacher Wirksamkeit, die Konzentration des Lactoflavins, die in allen Versuchen annähernd gleich blieb, der Fermentkonzentration gegenüber unendlich groß wird. Die Lactoflavinaktivierung tritt daher in solchen Präparaten stärker in Erscheinung als in an sich hoch aktiven Fumarathydraselösungen. Demgegenüber sei aber betont, daß die an adsorptiv inaktivierten Präparaten mit Kochsaft erhaltenen Wirksamkeitssteigerungen weit über den Rahmen einer gewöhnlichen Lactoflavinkatalyse hinausgehen. Hier kann es sich sehr wohl um eine Vereinigung des Fermentproteins mit einer von Lactoflavinphosphorsäure verschiedenen prostethischen Gruppe gehandelt haben.

C. Spaltung und Resynthese.

1. Theoretische Vorbemerkungen.

Die bisherigen Versuche haben zur Aufklärung der Natur und Wirkungsweise eines Aktivators beigetragen. Sie gestatteten aber über das Coferment der Fumarathydrase keine andere Aussage als die, daß es mit Lactoflavinphosphorsäure sicher nicht identisch ist. Eine einwandfreie Spaltung der Fumarathydrase ohne wesentlichen Verlust an Protein durchzuführen, gelang erst, nachdem O. Warburg und W. Christian ihre Methode der sauren Ammoniumsulfatfällung [23]) veröffentlicht hatten. Das Prinzip dieses ausgezeichneten Verfahrens ist, durch die saure Reaktion eine Spaltung herbeizuführen, und gleichzeitig durch Sättigung mit Ammoniumsulfat das Protein niederzuschlagen und vor der Denaturierung zu schützen. Die Spaltung der aus Hammelnieren gewonnenen d-Aminosäureoxydase nach dieser Methode, ergab eine Proteinkompenente, die mit dem von den genannten Autoren unter anderem auch aus Hefe isolierten neuen gelben Coferment zum wirksamen Ferment ergänzt werden konnte [23]). Das neue gelbe Coferment War-

burgs, Alloxazin-Adenindinucleotid besteht aus einem Mol Lactoflavinphosphorsäure und einem Mol Adenylsäure, die wahrscheinlich an ihren Phosphorsäuregruppen miteinander verbunden sind.



Neben der d-Aminosäureoxydase konnten von Warburg und seinen Mitarbeitern ferner die Xanthinoxydase [24]) und eine neue im System der Hexosephophatdehydrierung mit Methylenblau wirksame Dihydropyridindehydrase der Hefe [25]) durch Spaltung und Resynthese als „gelbe Fermente" identifiziert werden, deren Wirkungsgruppe das Dinucleotid darstellt. Auf Grund der früheren bei der Reaktivierung der Fumarathydrase mit Kochsäften gesammelten Erfahrungen, lag der Gedanke nahe, das neue Coferment, das ja über Lactaflavinphosphorsäure als gelbe Gruppe hinaus noch eine weitere farblose Komponente enthält, auf seine Bindungsfähigkeit an das Protein der Fumarathydrase zu prüfen.

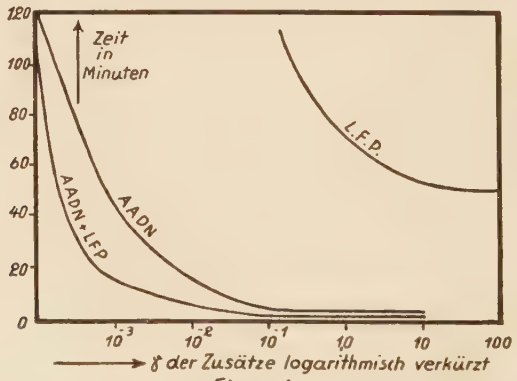
2. Nachweis der prostethischen Gruppe.

Eine kupplungsfähige, bis auf 1% der ursprünglichen Wirkung inaktivierte Lösung des Proteins der Fumarathydrase wurde durch dreimalige saure Ammoniumsulfatfällung in Anlehnung an die Warburg'sche Vorschrift erhalten. Es fiel zunächst auf, daß die anfangs geringe Eigenwirksamkeit der Proteinlösung im Laufe einiger Stunden jedesmal wieder auf das Doppelte anstieg (Proteinlösung A). Diese „Selbstaktivierung" deutete darauf hin, daß die Lösung noch abgespaltenes Coferment enthielt, welches in einer Zeitreaktion mit der Proteinkomponente zum wirksamen Ferment gekuppelt wurde. Beim Zusatz der bei der Spaltung erhaltenen, Coferment haltigen Restlösung zeigte sich anfänglich eine geringe Aktivierung, die sich aber innerhalb von 6 Stunden bis auf den ursprünglichen Wert der zum Spaltungsversuch verwendeten Ausgangslösung verstärkte. Im Gegensatz dazu bedarf die mit Lactoflavinphosphorsäure erreichbare Reaktivierung, die weit hinter der mit der Restlösung erzielten zurückbleibt, keiner Inkubationszeit. In den folgenden Versuchen (Proteinlösung B) wurden Rohfermentkochsaft, Alloxazin-Adenin-dinucleotid, reinste Cozymase und eine Lösung, die Codehydrase II enthielt [26]) auf ihre Fähigkeit geprüft, das Protein der Fumarathydrase zum wirksamen Ferment zu ergänzen. Alloxazin-Adenin-dinucleotid war nach O. Warburg und W. Christian [23]) aus Hefe rein dargestellt worden. Die beiden Codehydrasen zeigten, wie zu erwarten war, keinerlei Wirkung. Der Kochsaft lieferte eine Aktivierung, die mit derjenigen adsorptiv inaktivierter Präparate gut übereinstimmte, aber hinter den mit der Restlösung erzielten Werten weit zurückblieb.

Wahrscheinlich wird bei der Bereitung des Kochsaftes ein Teil des Cofermentes vom ausfallenden Eiweiß mit in den Niederschlag gerissen, sodaß dessen Wirksamkeit abgeschwächt wird. Eine sehr starke Reaktivierung ist hingegen beim Zusatz von Alloxazin-Adenin-dinucleotid zu beobachten. Dabei wird der Effekt der Restlösung nicht nur erreicht, sondern sogar noch überschritten. Der Versuch mit Dinucleotid und Restlösung ergibt keine höhere Wirksamkeit als der mit dem Dinucleotid allein. Daraus kann geschlossen werden, daß die Restlösung außer dem Dinucleotid keine weitere Komponente enthält, die zur Aktivierung der Fumarathydrase befähigt ist.

3. Aktivierungsgröße und Cofermentkonzentration.

Die letzten Beobachtungen rechtfertigen die Annahme, daß Alloxazin-Adenin-dinucleotid die Wirkungsgruppe der Fumarathydrase darstellt. Ein strenger Beweis fehlt allerdings noch. Er könnte geführt werden, indem man die Spaltung an einem reinen Fumarathydrasepräparat durchführt, und das Dinucleotid aus der Restlösung isoliert. Der Versuch scheitert an der Unbeständigkeit des reinen Fermentes und an der Schwierigkeit größere Mengen desselben zu erhalten. Ein indirekter Beweis besteht darin, daß man ungefähre Anhaltspunkte über die Leistungsfähigkeit des Dinucleotids im System der Fumarathydrase zu gewinnen versucht und diese mit seiner Wirkungsstärke in anderen Systemen und der von Cofermenten überhaupt vergleicht. Aus diesem Grunde wurde an einer besonders stark inaktivierten Proteinlösung (Proteinlösung C) die Abhängigkeit der Fumarathydrasewirksamkeit von der Konzentration des Dinucleotids eingehend studiert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Figur graphisch dargestellt.



Figur 1

Schon der kleinste Zusatz an Dinucleotid ($4 \cdot 10^{-4}$ γ) bewirkt eine Steigerung der Wirksamkeit auf das Doppelte. Bei hinreichender Konzen-

tration (8,0 γ) kann die praktisch völlig unwirksame Proteinlösung bis fast auf den Wert einer Rohfermentlösung reaktiviert werden. Lactoflavin allein vermag erst bei hohen Konzentrationen, und auch dann nur äußerst wenig, zu aktivieren. Die besten Wirksamkeitssteigerungen werden zweifellos ereicht, wenn Dinucleotid und Lactoflavin gleichzeitig vorhanden sind. Ein Vergleich der drei Kurven zeigt deutlich den Unterschied: Lactoflavin ist zur Erreichung der vollen Aktivität nicht unbedingt erforderlich; es stellt somit einen Aktivator der Fumarathydrase dar. Alloxazin-Adenin-dinucleotid hingegen ist eine unentbehrliches Coferment. Die aktivierende Wirkung des Lactoflavins macht sich am stärksten in denjenigen Ansätzen geltend, in denen die Konzentration des Dinucleotids am geringsten ist. Damit ist auch erklärt, weshalb in früheren Versuchen die größten Lactoflavinsteigerungen stets in den gereinigten und schwach wirksamen Lösungen nachgewiesen wurden.

4. Charakterisierung des Gleichgewichts.

Bei der Untersuchung der alten gelben Fermentpräparate nach Warburg und Christian, fand Theorell[7]), daß bei Zugabe der Wirkungsgruppenlösung zur Proteinkomponente die Wirkung streng proportional der Zusätze ansteigt, wobei die Wiedervereinigung augenblicklich eintritt. Ein Mol Lactoflavinphosphorsäure wird von einem Mol Fermentprotein gebunden. Darüber hinaus bewirkt ein noch so großer Überschuß an prostethischer Gruppe keine Erhöhung der Wirksamkeit mehr. Die Kurve Wirkungsgruppe/Wirkung verläuft daher absolut geradlinig und mit scharfem Knickpunkt.

Alloxazin-Adenin-dinucleotid und das Protein der Fumarathydrase müssen aber, wie eine Betrachtung der Figur 1 ergibt, sehr viel schwächer assoziiert sein. Das pH abhängige Dissoziationsgleichgewicht:

$$\text{Alloxazin-Adenin-dinucleotid} + \text{Protein} \rightleftarrows \text{Fumarathydrase}$$

ist also verschieden von dem des „alten" gelben Fermentes. Die Wirksamkeitssteigerung der Trägerlösung ist bei kleinen Konzentrationen an Dinucleotid am größten, da dann alles Coferment von dem überschüssigen Protein gebunden und an der Fermentwirkung beteiligt wird. Zur Wiederherstellung der vollen ursprünglichen Aktivität bedarf es aber eines großen Überschusses an prostethischer Gruppe. Die Kurve Wirkungsgruppe/Wirkung verläuft deshalb unter stetiger Krümmung und ohne Knickpunkt. Prostethische Gruppe und Eiweißkomponente binden sich also wahrscheinlich nicht in einfachem stöchiometrischem Verhältnis. Die volle Wirkung stellt sich auch nicht sofort, sondern erst nach einer gewissen Inkubationszeit ein. Umgekehrt wird die Inaktivierung um so vollständiger, je länger das Ferment der sauren Reaktion ausgesetzt wird. Spaltung und Resynthese sind also langsam verlaufende Reaktionen. Zahlreiche bisher unerklärliche Befunde lassen sich auf diese Verhältnisse zurückführen. Ammoniumsulfatfällun-

gen unterhalb des Neutralpunktes pH 7 haben bereits Wirksamkeitsverluste zur Folge. Da die maximale Aktivität der Fumarathydrase an einen Überschuß des Dinucleotids gebunden ist, führt auch die Dialyse zu einer starken Abschwächung ihrer Wirksamkeit. Eine Zurückdrängung der Dissoziation mit steigendem pH dürfte für die bei Ammoniumsulfatfällungen und Elektrophoreseversuchen beobachtete optimale Stabilität der Fumarathydrase im schwach alkalischen Gebiet verantwortlich zu machen sein.

Gleichgewichte dieser Art sind in der Fermentliteratur nicht ohne Beispiel. Die von H. Albers und seinen Mitarbeitern beschriebenen Gleichgewichtsverhältnisse der Phosphatasen aus Niere und Hefe [27]) zeigen eine auffallende Übereinstimmung mit den an der Fumarathydrase gemachten Beobachtungen.

5. Wirkungsstärke des Cofermentes.

Bei sehr kleiner Konzentration an Alloxazin-Adenin-dinucleotid kann man annehmen, daß seine Bindung an das überschüssige Protein nahezu vollständig ist. Das Dinucleotid entfaltet also unter diesen Bedingungen eine optimale Leistungsfähigkeit. Seine Wirkungsstärke läßt sich aus den Versuchsdaten (Tabelle 17, Seite 57) in folgender Weise berechnen: $4 \cdot 10^{-4}$ γ Dinucleotid (Mol-gewicht des Bariumsalzes 920) $= 4 \cdot 10^{-10}$ gr. $= \frac{4 \cdot 10^{-10}}{920} = 4{,}4 \cdot 10^{-13}$ Mole Dinucleotid bewirken die Reoxydation von $8 \cdot 10^{-8}$ Molen Leukomethylenviolett in 65 Minuten oder von $\frac{8 \cdot 10^{-8}}{65} = 1{,}2 \cdot 10^{-9}$ Molen pro Minute. Ein Mol Dinucleotid überträgt also in der Minute $\frac{1{,}2 \cdot 10^{-9}}{4{,}4 \cdot 10^{-13}} = 2800$ Mole Wasserstoff von Leukomethylenviolett auf Fumarsäure. O. Warburg und W. Christian haben für das Dinucleotid im System der Aminosäuredehydrierung eine Wirkungsstärke von 1440 Molen übertragenen Sauerstoffs pro Minute berechnet [23]). Die Leistungsfähigkeit dieses gelben Cofermentes bei der Hydrierung der Fumarasäure ist also außerordentlich hoch und stimmt sehr gut mit der in anderen Fermentsystemen enfalteten Wirksamkeit überein.

D. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen.

Indem Alloxazin-Adenin-dinucleotid als prostethische Gruppe der Fumarathydrase identifiziert werden konnte, ist die Zugehörigkeit dieses Enzyms zu den Flavoproteinen endgültig bewiesen worden. Eine Abtrennung der Fumarathydrase von den beiden im System der Hexosephosphatdehydrierung wirksamen Methylenblau hydrierenden gelben

Fermenten wurde bei der Elektrophorese erzielt. Xanthinoxydase und Aminosäuredehydrase sind in dem als Ausgangsmaterial verwendeten Rohfermentpräparat nicht enthalten. Die Rekombination einer aus einem „alten" absolut Fumarathydrase freien Flavinenzym erhaltenen Proteinlösung mit dem Dinucleotid, ergab keinerlei Fumarsäure hydrierende Wirksamkeit. Fumarathydrase ist also ein gelbes Ferment, das weder mit den bisher bekannten „natürlichen" Flavoproteinen, noch mit dem von O. Warburg synthetisierten „künstlichen" Ferment [28]) identisch ist.

Die Stellung der Fumarathydrase innerhalb der bekannten Oxydoreduzierenden Fermentsyste ist bereits früher diskutiert worden[3]) [10]). Die vorliegenden Untersuchungen haben zur weiteren Klärung dieser Frage beigetragen. Die Anwesenheit ihrer gelben Gruppe dürfte die Fumarathydrase zu einem unmittelbaren Wasserstoffaustausch mit den beiden Codehydrasen befähigen, die ihrerseits Wasserstoff durch Vermittlung der Zwischenfermente von zahllosen Substraten beziehen können.

Die Reaktionsfolge:

$$\text{Substrate} \rightarrow \begin{matrix}\text{Dehydrasen} + \\ \text{Codehydrasen}\end{matrix} \rightarrow \text{Fumarathydrase} \rightarrow \text{Fumarsäure}$$

kann als der einfachste und wahrscheinlichste Weg der Hydrierung von Fumarsäure angesehen werden. Für die Richtigkeit dieser Ansicht spricht vor allem auch die weitgehende Übereinstimmung aller untersuchten Eigenschaften zwischen Fumarathydrase und den beiden anderen Codehydrase spezifischen Methylenblau oder Sauerstoff hydrierenden Flavoproteinen. In Anbetracht der bekannten Fähigkeit der Fumarathydrase, Wasserstoff lediglich von stark negativen Redoxsubstanzen aufzunehmen, bedeutet auch das außerordentlich niedrige Redoxpotential der Codehydrasen [29]) eine weitere Stütze dieser Annahme. Die unmittelbare Oxydation der beiden Codehydrasen mittels Fumarathydrase ist also möglich. Es fragt sich nur, ob diese Wasserstoffübertragung genügend rasch von statten geht, so daß sie mit den Reaktionen der übrigen Codehydrase oxydierenden Fermente, der Diaphorase [54]) (Coezymfaktor) und der anderen Flavoproteine in Konkurrenz treten kann. Darüber ist freilich vorläufig keine Aussage möglich.

Neben den beiden Codehydrasen dürfte ferner zweifellos das reduzierte Lactoflavin als natürlicher Wasserstoffdonator der Fumarathydrase eine erhebliche Rolle spielen. Die Reaktionen der fermentativen Hydrierung von Lactoflavin sind von Wagner-Jauregg und seinen Mitarbeiten ausführlich beschrieben worden. Eine Reduktion von Lactoflavin findet mit Präparaten aus Hefe und tierischem Gewebe in Anwesenheit zahlreicher Substrate, kurzum in den meisten Fermentsystemen, die auch zu einer Entfärbung von Methylenblau befähigt

sind [30]). Dehydrasen, Codehydrasen und Flavinenzym sind als notwendige Komponenten Flavin reduzierender Systeme gekennzeichnet worden [31]):

$$\text{Substrate} \rightarrow \begin{matrix}\text{Dehydrasen} + \\ \text{Codehydrasen}\end{matrix} \rightarrow \text{Flavinenzyme} \rightarrow \textbf{Lactoflavin}$$

Die Frage nach dem weiteren Verbleib des Wasserstoffs mußte allerdings offen bleiben, da keinerlei fermentative Dehydrierungen des reduzierten Flavins bekannt waren. Indem nun für Fumarathydrase die Fähigkeit zu einem außerordentlich raschen oxydativen Angriff des Leukoflavins nach gewiesen worden ist, kann eine Ergänzung des obigen Schemas vorgenommen werden:

$$\text{Lactoflavin} \rightarrow \text{Fumarathydrase} \rightarrow \text{Fumarsäure.}$$

Die allgemeine Verbreitung des freien Flavins in lebenden Zellen läßt eine bestimmte physiologische Funktion desselben vermuten, nämlich die eines niedermolekularen leicht diffundierbaren Wasserstoffüberträgers zwischen räumlich getrennten Fermentsystemen. Ob dabei nur die Fumarsäure als Oxydationsmittel des Leukoflavins in Frage kommt, kann vorläufig nicht entschieden werden. Immerhin würde der Wasserstoff von der so entstehenden Bernsteinsäure aus in den normalen Bahnen der Atmung weitergeleitet werden. Eine Atmungssteigerung durch Lactoflavin, wie sie in Bindegewebskulturen [32]) und Milchsäurebakterien [33]) beobachtet wurde, könnte auf eine derartige Überträgerwirkung des Flavins zurückgeführt werden.

III. Teil.

Zusammenhang zwischen Fumarathydrase und Succinodehydrase.

A. Kennzeichnung des Problems.

Die folgenden Untersuchungen beschäftigen sich mit den Beziehungen der Fumarathydrase zu einem weiteren Ferment, das gleich ihr Fumarsäure zu hydrieren vermag. „Succinodehydrase" ist in der biochemischen Literatur seit bereits 40 Jahren als eines der wichtigsten und meist erforschten Fermente bekannt. Ein Vergleich seiner von zahlreichen Forschern beschriebenen Eigenschaften mit denen der Fumarathydrase ist bereits in früheren Arbeiten [3] [10]) durchgeführt worden. Er brachte einen klaren Beweis für die Nichtidentität der beiden Enzyme. Die Hauptunterschiede sind kurz zusammengefaßt die folgenden:

1. Succinodehydrase katalysiert als einziges bisher bekanntes Ferment ein echtes, reversibles Gleichgewicht bei Gegenwart von Substrat und Akzeptor [34]). Fumarathydrase ist hingegen nur zur Hydrierung von Fumarsäure, nicht aber zur Dehydrierung von Bernsteinsäure befähigt.
2. Die Wasserstoffübertragung auf Fumarsäure mittels Succinodehydrase ist mit allen Leukofarbstoffen möglich, deren Redoxpotential unterhalb des von H. Borsook und H. Schott zu 0,01 Volt bestimmten Potentials des enzymatisch aktivierten Substanzpaares Fumarat/Succinat liegt [35]). Fumarathydrase vermag hingegen Wasserstoff nur von Leukofarbstoffen mit einem negativeren Potential als —0,1 Volt zu übernehmen.
3. Die Wirkung der Succinodehydrase wird durch verschiedene Gifte (Malonat, Oxalat, Fluorid usw.) vollständig gehemmt [36]), die auf Fumarathydrase keinen oder doch nur geringen Einfluß haben.
4. Succinodehydrase gehört zu den unlöslichen, fixierten Fermenten. Eine Abtrennung ihrer Wirksamkeit von Zelltrümmern ist bis heute nicht gelungen. Fumarathydrase ist demgegenüber ein leicht lösliches Enzym, das einer weitgehenden Reinigung zugänglich ist.

Die Verschiedenheit von Fumarathydrase und Succinodehydrase wurde nun auch bezüglich des Vorkommens der beiden Fermente unter-

sucht. Succinodehydrase ist in allen tierischen Geweben, sowie in Bakterien und einigen niederen Pilzen stark verbreitet. Ihr Vorkommen in der Hefe ist dagegen immer noch sehr umstritten. Auch in höheren Pflanzen scheint das Ferment zu fehlen. Fumarathydrase wurde bisher nur aus Hefe isoliert.

Ist nun das Vorkommen der Fumarathydrase auf die Hefe beschränkt, oder findet man sie entweder für sich oder gar mit Succinodehydrase vergesellschaftet auch noch in anderen Zellen vor? Dies war nun die nächste Frage. Bei dem Versuch dieses Problem zu lösen, wurden dann einige Beobachtungen gemacht, die einen gewissen genetischen Zusammenhang der beiden Fumarsäure hydrierenden Enzyme vermuten lassen.

B. Die Fumaratwirkung der Succinodehydrase.

In Anwesenheit von Fumarat ist Succinodehydrase ebenso wie Fumarathydrase zur Dehydrierung von Leukomethylenviolett befähigt.

$$\text{Leukomethylenviolett} + \text{Fumarsäure} \xrightarrow[\text{Fumarathydrase}]{\text{Succinodehydrase oder}} \text{Methylenviolett} + \text{Bernsteinsäure}$$

Eine im Leukomenthylenviolettversuch wahrnehmbare Fumarsäure hydrierende Wirkung kann nur dann mit Sicherheit der Fumarathydrase zuerteilt werden, wenn das gleiche Präparat im Methylenblauversuch mit Bernsteinsäure als Substrat unwirksam ist.

$$\text{Bernsteinsäure} + \text{Methylenblau} \xrightarrow[\text{hydrase}]{\text{Succinode-}} \text{Fumarsäure} + \text{Leukomethylenblau}$$

Ein Nachweis von Fumarathydrase und Succinodehydrase nebeneinander ist damit aber so gut wie unmöglich. Er kann nur dann geführt werden, wenn eine Fumarathydrase freie Succinodehydrase zur Verfügung steht. Mit einem solchen Präparat kann das Wirksamkeitsverhältnis der Succinodehydrase in beiden Testen bestimmt werden, das heißt, es kann festgestellt werden, welche Wirksamkeit im Fumarattest an eine bestimmte Succinatwirkung der Succinodehydrase gekoppelt ist. Präparate, die Fumarathydrase neben Succinodehydrase enthalten, können dann an einer Verschiebung dieses Verhältnisses zu Gunsten der Fumaratwirkung erkannt und auch quantitativ ausgewertet werden.

Das Verhältnis der Wirksamkeit im Fumarat- und Succinatversuch wurde (unter den im experimentellen Teil festgelegten Bedingungen) für eine aktive Succinodehydrase aus Taubenbrustmuskel festgestellt. In Anwesenheit von Succinat wurden 0,25 ccm m/1000 Methylenblau $= 25 \cdot 10^{-8}$ Mole in 4 Minuten 20 Sekunden entfärbt. Es waren also im Succinattest $6 \cdot 10^{-8}$ Mole Wasserstoff pro Minute übertragen wor-

den. Die gleiche Menge desselben Succinodehydrasepräparates bewirkte die 10 bis 50%ige Reoxydation von 1 ccm m/5000 Leukomethylenviolett $= 8 \cdot 10^{-8}$ Mole in 20 Sekunden. Die Wasserstoffübertragung betrug also im Fumarattest $24 : 10^{-8}$ Mole pro Minute und erfolgte demnach 4 mal rascher als im Succinatversuch. Das besagt aber keineswegs, daß Succinodehydrase in der Hydrierung von Fumarsäure leistungsfähiger ist als in der Dehydrierung von Bernsteinsäure. Die höhere Wirkung im Fumaratversuch ist nur eine scheinbare, da die Reaktionsgeschwindigkeiten mit abnehmenden Farbstoffkonzentrationen stark verlangsamt werden. Mißt man im Fumaratversuch eine 100%ige, statt einer 10—50%tigen Wiederfärbung, so findet man etwa die 4fache Zeit. Die Übertragung des Wasserstoffs geht also in Wirklichkeit in beiden Systemen ungefähr gleich schnell vor sich. Wir halten uns daher in allen Versuchen an die festgelegten Testbedingungen (siehe Seite 38) und multiplizieren den Succinatwert stets mit dem Faktor 4. Das Wirksamkeitsverhältnis im Fumarat- und Succinatversuch (abgekürzt F : S) beträgt dann also für Succinodehydrase F : S $= 1 : 1$.

C. Tierische Gewebe.

Ausgangsmaterial für die folgenden Versuche war die Muskulatur von Fröschen oder Tauben. Es wurden sowohl frische, als auch getrocknete Gewebe, sowie deren Preß- und Macerationssäfte auf ihre Wirksamkeit im Fumarat- und Succinattest hin untersucht.

1. Frisches Gewebe und Preßsäfte.

Die Suspensionen des frischen Gewebes aus Taubenbrustmuskel zeigen eine sehr aktive Succinodehydrasewirksamkeit in beiden Testen. Falls nun Fumarathydrase, neben Succinodehydrase in tierischen Geweben enthalten ist, könnte ihre Wirksamkeit als die eines löslichen Enzyms wenigstens teilweise in den Gewebepreßsäften nachweisbar sein. Eine Prüfung der leicht getrübten, schwach rosagefärbten Säfte ergab bei Frosch- und Taubenmuskel eine Fumarat-Succinatwirkung, die zwischen 1 : 1,3 und 1,3 : 1 schwankte. Die Gewebepreßsäfte enthielten demnach sicherlich keine Fumarathydrase. Dies ließ sich auch zeigen, indem man die trüben Lösungen längere Zeit hochtourig zentrifugierte. Dabei nahm die Aktivität, proportional der Menge der auftretenden geringfügigen Niederschläge ab. Wirbelt man die Rückstände in wenig Wasser auf, so wird die verschwundene Wirksamkeit größtenteils wiedergefunden. Sie beruht also einwandfrei auf Succinodehydrase.

Auffallend war der geringe Gehalt des Kaltblütermuskels an Succinodehydrase, im Vergleich zum Warmblütermuskel. Er dürfte wohl

durch den Winterschlaf der Frösche und die damit zusammenhängende Einschränkung der Stoffwechselvorgänge bedingt gewesen sein. Die geringe Wirksamkeit des Froschmuskels wurde fast vollständig in den Preßsäften gefunden, während die hohe Aktivität des Taubenmuskels nur zu einem Bruchteil von den Gewebsfasern abgetrennt werden konnte.

2. Trockengewebe und Macerationssäfte.

Wenn in den Preßsäften frischer Gewebe keine Fumarathydrase nachweisbar war, so wäre es falsch, daraus auf ein unbedingtes Fehlen dieses Fermentes im Tierkörper schließen zu wollen, da über die Art seiner Verankerung in den Zellen bisher nichts bekannt ist. Es kann sehr wohl sein, daß, ähnlich wie bei der Hefe, ein autolytischer Abbau von Trägersubstanzen Vorbedingung für die Löslichmachung der Fumarathydrase ist. Aus diesem Grunde wurden getrockneter Muskel und aus ihm dargestellte Macerationssäfte mit in die Untersuchung einbezogen. Zwei Arten von Trockenmuskeln kamen dabei zur Verwendung, aus gefrorenem Zustand im Vacuum getrockneter, und bei ca. 35° C an der Luft getrockneter, die im folgenden abgekürzt als kalt bzw. warm getrockneter Muskel bezeichnet werden.

Es zeigte sich, daß beim Trocknen des Gewebes, weder in der Kälte noch in der Wärme, eine nennenswerte Verschiebung des Fumarat-Succinatverhältnisses eingetreten war. Im kalt getrockneten Muskel waren unmittelbar nach seiner Darstellung noch rund 40% der Succinodehydrasewirksamkeit des frischen Gewebes nachweisbar. Das Trockenpulver war aber bei Zimmertemperatur nicht unbegrenzt haltbar. Im Laufe von 14 Tagen verlor es etwa die Hälfte seiner Wirksamkeit, jedoch ohne eine Verschiebung seines FS-Verhältnisses. Beim warmen Trocknen an der Luft sind die Verluste an Succinodehydrase naturgemäß wesentlich größer gewesen.

Eine deutliche Verschiebung des genannten Wirksamkeitsverhältnisses zu Gunsten der Fumaratwirkung ergab sich nun aber in den aus Trockenmuskel dargestellten Macerationssäften. Die Fumarat-Succinatwerte verhielten sich durchschnittlich wie 3 : 1 (Tabelle 19, Seite 59). Die absolute Aktivität der Macerationssäfte war außerordentlich schwankend und stand im Zusammenhang mit ihrem Trübungsgrad. Bei langem hochtourigem Zentrifugieren ließ sich aber, im Gegensatz zu den Gewebepreßsäften, ihre Wirksamkeit nicht vollständig, sondern nur zum größten Teil herauszentrifugieren. Ein geringer Bruchteil an Fumaratwirkung blieb in den absolut wasserklaren gelben Lösungen zurück. Er entsprach nach mehreren Versuchen 0,07 Fumarathydraseeinheiten und betrug, bezogen auf das Gewicht des macerierten Trokkenmuskels, etwa ein Drittel derjenigen Fermentmenge, die beim Macerieren von Trockenhefe in Lösung gebracht werden kann. Die Succi-

natwirkung des Präparates war, da bei den außerordentlich langen Entfärbungszeiten Fermentschädigungen unvermeidlich sind, nicht mit Sicherheit bestimmbar. Das Verhältnis dürfte aber wohl wesentlich mehr zu Gunsten des Fumarats gelegen haben als in den gewöhnlichen Macerationssäften. Die Beständigkeit der Fermentwirkung in trüben oder klar zentrifugierten Macerationssäften ist außerordentlich gering. Aufbewahrung bei 0°, rascher noch eine Dialyse, führen in kurzer Zeit zu vollständiger Inaktivierung. Fällt man die Säfte bei 0° mit Ammoniumsulfat 66% Sättigung entsprechend, so verbleibt keine Aktivität in der Restlösung. Die wiederaufgelöste Fällung enthält aber nur etwa $^1/_6$ der ursprünglichen Wirksamkeit. Eine Kontrolle, die während der gleichen Zeit bei 0° gestanden hatte, wurde etwa zur Hälfte inaktiviert. Bei Zugabe von Alloxazin-Adenin-dinucleotid zu diesen Lösungen ist keinerlei Reaktivierung zu beobachten. Die mitgeteilten Ergebnisse lassen vermuten, daß die Fumarathydrase zwar normalerweise im tierischen Gewebe nicht vorkommt, daß sie aber nach entsprechender Vorbehandlung desselben „künstlich" gebildet werden kann. Scheint es doch so, als ob die Succinatwirkung als die empfindlichere von beiden Eigenschaften der Succinodehydrase, Eingriffe wie die einer Maceration nur teilweise zu überstehen vermag, während die Fumaratwirkung erhalten bleibt. Die hier angedeutete Möglichkeit eines Zusammenhanges der beiden Enzyme kann durch ähnliche Untersuchungen an der Hefe noch wahrscheinlicher gemacht werden.

D. Hefe und Hefepräparate.

Der Nachweis einer Succinodehydrase in Hefe konnte bislang nur unvollkommen geführt werden. Ogston und Green halten ein Vorkommen dieses Fermentes in der Hefe zum mindesten für zweifelhaft [37]). Wieland und Sonderhoff erhielten zwar in Versuchen mit verarmter Hefe nach Zugabe von Succinat starke Atmungssteigerungen [38]), die aber später auf eine Infektion der Hefe durch Bakterien zurückgeführt werden mußten [39]). W. Robertson konnte bei einer Wiederholung dieser Versuche ebenfalls keine Succinodehydrase nachweisen [10]). Zwei Befunde der letzten Zeit sprechen jedoch auch für die Anwesenheit dieses Fermentes. So beobachtete T. Thunberg eine Verkürzung der Entfärbungszeit von Methylenblau in Gegenwart von Succinat durch Phosphat freie Hefeaufschlämmungen [40]). Ferner erhielten H. Wieland und Mitarbeiter neuerdings Atmungssteigerungen bei Zusatz von Succinat zu Hefe, die durch Einfrieren in flüssiger Luft plasmolysiert war [41]).

Eine erneute Nachprüfung dieser Frage erschien, namentlich im Zusammenhang mit den am tierischen Gewebe auffälligen Beobachtungen für die weitere Aufklärung der Beziehungen zwischen Fumarathydrase und Succinodehydrase von großer Wichtigkeit.

1. Lebende und plasmolysierte Hefe.

In den Suspensionen sorgfältig ausgewaschener, lebender Hefezellen kann Succinodehydrase im Thunbergversuch nicht nachgewiesen werden. Die Entfärbungszeiten von Methylenblau sind mit und ohne Succinat dieselben. Das Resultat ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, daß die Succinodehydrase bereits bei minimalen Substratkonzentrationen eine optimale Wirkung entfaltet [42]). Angesichts der Unmöglichkeit, die Substrate intakter Zellen durch Auswaschen vollständig zu entfernen, besagt der Versuch über An- oder Abwesenheit der Succinodehydrase nicht das geringste. Zu den weiteren Untersuchungen wurden die Hefezellen plasmolysiert. Ihre Substrate können dann leicht ausgewaschen werden. Das Einfrieren der Zellen in flüssiger Luft und Wiederauftauen ist wohl die schonendste Art der Plasmolyse, die man sich denken kann. Man erhält so Präparate, die in Übereinstimmung mit den Angaben Wielands [41]) eine deutliche Succinodehydrasewirksamkeit im Methylenblauversuch zeigen. Berechnet man, wie beim tierischen Gewebe, das zugehörige Fumarat-Succinatverhältnis, so ergeben sich $10,5 \cdot 10^{-8}$ Mole übertragenen Wasserstoffs pro Minute im Fumarattest, gegenüber $1,7 \cdot 10^{-8}$ Molen im Succinatversuch. Das Wirksamkeitsverhältnis beträgt also $F \cdot S = 2,4 \cdot 1$. Vergleicht man nun damit die Aktivität von bei Zimmertemperatur mittels Essigester plasmolysierten Zellen, so sieht man, daß gerade noch ein Bruchteil an Fumaratwirkung übrig geblieben ist. Der Succinatwert ist sogar so gering, daß er überhaupt nicht mehr exakt gemessen werden kann. Die Succinodehydrase der Hefe ist durch den Eingriff der Essigesterplasmolyse bereits fast vollkommen zerstört worden.

Es ist nun eine weitere Frage, ob das in den durch Einfrieren gesprengten Zellen aufgefundene Verhältnis $F : S = 2,4 : 1$ der Fermenttätigkeit der intakten lebenden Hefe entspricht, oder ob es schon einen verschobenen Wert darstellt. Im ersten Fall würde das bedeuten, da für Succinodehydrase das Wirksamkeitsverhältnis 1 : 1 feststeht, daß in der Hefe Fumarathydrase neben Succinodehydrase vorhanden ist. Im zweiten Fall müßte man folgern, daß Fumarathydrase in der lebenden Zelle nicht vorkommt, sondern erst bei ihrem Tode und der nachfolgenden chemischen Behandlung der Zellsubstanz aus der im Leben allein wirksamen Succinodehydrase der Hefe gebildet wird.

In diesem Zusammenhang gewinnt eine Beobachtung von W. Robertson [10]) große Bedeutung. Er konnte in präparativen Ansätzen mit gärender, lebender Hefe zugesetzte Fumarsäure quantitativ zurückerhalten, mit gärendem Macerationssaft und Aceton-Trockenhefe aber Bernsteinsäure in guter Ausbeute isolieren. Die Fähigkeit der Fumarathydrase Fumarsäure abzusättigen schien ihm nur dann nachweisbar zu sein, wenn das Ferment aus der Zelle losgelöst oder wenn seine normale Funktion in dem Hefepilz gestört ist.

In Anbetracht dieses Befundes und der nachgewiesenen außerordentlichen Empfindlichkeit der Hefesuccinodehydrase, besitzt die zweite Annahme wohl einen höheren Grad an Wahrscheinlichkeit. Die Zerstörung eines Teiles der Succinodehydrase müßte dann allerdings schon durch den mechanischen Eingriff allein erfolgt sein, da Temperaturen von −180° nach Quastel und Wooldridge ohne schädlichen Einfluß auf das Ferment sein sollen [43]).

2. Trockenhefe und Macerationssäfte.

Weitere quantitative Vergleiche von Fumarat- und Succinatwirkung an verschiedenen Präparaten sollten nun der Feststellung dienen, ob eine eventuelle Verschiebung des FS-Verhältnisses zu Gunsten des Fumarats in Zusammenhang gebracht werden kann mit der Art der Vorbehandlung der Präparate. Drei verschiedene Sorten von Trockenhefe und deren Macerationssäfte wurden untersucht: kalt getrocknete Hefe aus gefrorenem Zustand im Vacuum getrocknet, warm getrocknete Hefe die übliche Trockenhefe und Aceton-Dauerhefe. Es ergab sich, daß beim Trocknen der Hefe aus dem gefrorenen Zustand fast die gesamte Aktivität im Fumaratversuch erhalten bleibt, während die Succinatwirksamkeit größtenteils verschwindet. Das Wirksamkeitsverhältnis verschiebt sich dabei auf 10 :1 zu Gunsten des Fumarats. Die gewöhnliche Art des Hefetrocknens bei erhöhter Temperatur an der Luft vernichtet hingegen fast die gesamte fermentative Wirksamkeit. Was übrig bleibt ist nur etwa $^1/_{20}$ der Fumaratwirkung, die in den durch Einfrieren gesprengten Zellen nachweisbar ist, also auf keinen Fall mehr als $^1/_{20}$ der Wirkung lebender Zellen. Der zugehörige Succinatwert ist so gering, daß das FS-Verhältnis nicht mit Sicherheit bestimmt werden kann. Die Behandlung mit Aceton und Äther führt ebenfalls zu sehr starken Schädigungen der Succinatwirkung, während die Fumaratwirkung zu ungefähr 25% erhalten bleibt. Dadurch kommt es in Aceton-Dauerhefe zu einer Verschiebung des FS-Verhältnisses auf 23 : 1. Die Ergebnisse dieser Versuche liegen also durchaus im Sinne der bereits angedeuteten Theorie. Je stärker die Eingriffe sind, die an der Hefesuccinodehydrase vorgenommen werden, umso mehr scheint ihr die Fähigkeit der Bernsteinsäuredehydrierung verloren zu gehen, wobei die Fumarat hydrierende Wirkung mehr oder weniger erhalten bleibt.

Die bisherigen Befunde wurden an Suspensionen zerstörter Hefezellen abgeleitet. Dabei war die Fermentwirkung noch an die Zelltrümmer fixiert. Eine Loslösung von der Zellstruktur findet bei der Maceration statt. Vergleicht man die Fumarathydrasewirksamkeiten von unter sonst gleichen Bedingungen hergestellten Macerationssäften aus warm und kalt getrockneter Hefe, so erweist sich der Saft aus warm getrockneter Hefte, die ja nur etwa den zwanzigsten Teil der Fumarataktivität von kalt getrockneter Hefe besitzt, etwa drei bis viermal

wirksamer als der der anderen Trockenhefeart. Aus warm getrockneter Hefe können ungefähr 60% der in ihr noch enthaltenen geringen Fumarataktivität durch Maceration herausgelöst werden, während die kalt getrocknete Hefe nur einen minimalen Bruchteil ihrer hohen Wirksamkeit in löslicher Form abgibt.

Offenbar ist also eine gewisse proteolytische Zersetzung der Hefe, die beim langsamen Trocknen in der Wärme zweifellos eintritt [44]) unerläßliche Vorbedingung für eine Löslichmachung der Fumarathydrase. Der Anteil der Fumarsäure hydrierenden Wirkung lebender Hefe, der nach geeigneter Vorbehandlung in Lösung gebracht werden kann, ist außerordentlich gering. Beträgt die Fumaratwirkung von durch Einfrieren gesprengten Hefezellen 28 Sekunden für 0,05 gr Frischgewicht und die des besten Macerationssaftes 2 Minuten 20 Sekunden für 0,08 gr Trockenhefe bzw. 0,32 gr frischer Hefe, so berechnet sich aus diesen Daten der löslich erhaltene Anteil der Wirksamkeit mit 3% eher zu hoch als zu nierdrig.

3. Gereinigte Fermentlösungen.

Die aufgezeigten Beziehungen wischen Fumarat- und Succinatwirkung werden noch deutlicher, wenn man gereinigte Fermentlösungen mit in die Untersuchung einbezieht. Das gewöhnliche Rohfermentpräparat erweist sich mit einem FS-Verhältnis von 10 : 1 keineswegs frei von Succinatwirkung. Eine Autolyse der Hefe mit Essigester, die nach früheren Versuchen, Schädigungen der Fumarathydrase zur Folge hat, drückt ihre Succinatwirkung weitaus tiefer herab, denn das aus Essigesterautolysaten dargestellte Rohferment zeigt bereits ein FS-Verhältnis von 27 : 1.

Fumarathydrase erscheint so als eine „künstlich verdorbene", löslich gemachte Succinodehydrase, die ihre Fähigkeit zur Dehydrierung von Bernsteinsäure größtenteils eingebüßt hat. Ein konstantes FS-Verhältnis kann für sie nicht angegeben werden. Die Succinatwirkung ist im gewöhnlichen Rohferment noch ziemlich groß. Sie kann aber bei entsprechend vorbehandelten Präparaten sehr klein werden. Eine solche „ideale" Fumarathydrase erhält man bei der Spaltung des Rohfermentes und der Resynthese mit dem Dinucleotid. Die einmalige Behandlung mit saurem Ammoniumsulfat hat bekanntlich nur eine sehr geringfügige Spaltung der Fumarathydrase zur Folge. (Proteinlösung A). Sie führt aber bereits zu einer Verschiebung des FS-Verhältnisses auf 32 : 1, das in der rekombinierten Lösung dann auf 80 : 1 zu Gunsten der Fumaratwirkung ansteigt.

Bei dem vermutlichen Zusammenhang zwischen Fumarathydrase und Succinodehydrase drängt sich unwillkürlich der Gedanke auf, auch der Succinodehydrase den Charakter eines gelben Fermentes zuzusprechen. Der Versuch besagt aber darüber noch garnichts. Die Succinat-

wirkung der Proteinlösung erfährt zwar nach der Zugabe des Dinucleotids eine außerordentlich schwache Aktivierung; diese stellt aber nur einen Bruchteil der erreichbaren Fumarataktivierung dar. Die saure Ammoniumsulfatfällung zieht bereits so starke Schädigungen der Succinatwirkung nach sich, daß eine eventuelle Reaktivierung sich dem sicheren experimentellen Nachweis entzieht.

E. Sonstige pflanzliche Zellen.

Fumarsäure hydrierende Wirkung dürfte, außer in tierischem Gewebe und in Hefe, zweifellos auch in höheren Pilzen, und in den Samen einiger Blütenpflanzen enthalten sein. Bei seinen Arbeiten über die Pflanzendehydrasen hat T. Thunberg zwar ein Donatorvermögen für Bernsteinsäure so gut wie immer vermißt [45]). Lediglich verschiedene Bohnenarten schienen ihm Succinodehydrase in geringen Konzentrationen zu enthalten [46]).

Mit Hilfe der empfindlicheren Leukomethylenviolettreaktion war nunmehr ein sicherer Nachweis dieses Fermentes nicht nur in Bohnen, sondern darüber hinaus auch in zahlreichen anderen pflanzlichen Materialien möglich, in denen es höchstens spurenweise vorkommt. Berechnet man aus den Versuchsdaten das Fumarat-Succinat-verhältnis für die aktivsten der erhaltenen Pflanzenextrakte (Erbsen und Bohnen), so ergeben sich Werte, die mit F : S = 1, 6 : 1 für die gefundene Wirksamkeit die Anwesenheit einer Succinodehydrase verantwortlich machen. Das gleiche dürfte auch für die außerordentlich geringe Aktivität der anderen untersuchten Samen (Hanf, Mais, Hirse, Kastanien) der Fall sein, deren Wirksamkeit in dem gröberen Methylenblauversuch bereits der Wahrnehmung entgeht.

F. Flavine als Wasserstoffdonatoren der Succinodehydrase.

Von K. Laki wurde mitgeteilt, daß Succinodehydrase zur Wasserstoffübertragung auf Fumarsäure die reduzierte Stufe des gelben Fermentes nutzbar machen könne [47]). Das Ergebnis wurde an der Succinodehydrase des Taubenbrustmuskels abgeleitet, wobei gelbes Rohferment zur Verwendung kam, das zweifelsfrei Fumarathydrase in hohen Konzentrationen enthielt. Der beobachtete Effekt einer langsamen Wiederfärbung des Leukoflavinenzyms war daher nicht zu verwundern, da Fumarathydrase zu dieser Wasserstoffübertragung tatsächlich fähig ist [3]). Die Versuche von Laki haben J. Banga zu der Behauptung veranlaßt, daß die Rolle des gelben Fermentes in dem Szent-Györgyi'schen Atmungszyklus die eines Wasserstoffvermittlers zwischen der an Äpfelsäure aktivierten Malicodehydrase und der an Fumarsäure aktivierten

Succinohydrase sei [48]). Eine derartige Funktion des gelben Fermentes kann aber, ganz abgesehen von dem Laki'schen Trugschluß, mit Recht angezweifelt werden, da eine unmittelbare Wasserstoffübertragung zwischen zwei hochmolekularen Systemen, als die sich gelbes Ferment und Succinodehydrase darbieten, nur äußerst langsam von statten gehen kann. Ein schnellerer Wasserstofftransport wäre höchstens unter Vermittlung der vom gelben Ferment abdissoziierenden freien Wirkungsgruppe oder von Lactoflavin als niedermolekularem, leicht diffundierbarem Überträger denkbar.

Die Nachprüfung der Laki'schen Versuche an einem absolut Fumarathydrase freien gelben Ferment bewies nun die Richtigkeit des erhobenen Einwandes. Eine Wiederfärbung von Leukoflavinenzym in Anwesenheit von Succinodehydrase und Fumarat trat nicht ein. Das Ergebnis steht im Einklang mit den von Euler und seinen Mitarbeitern veröffentlichten Versuchen [49]). Die dem gelben Ferment in dem genannten Atmungszyklus zugesprochene Funktion ist also damit widerlegt worden.

In dem Verhalten Flavinen gegenüber deutet sich also hier ein weiterer Unterschied zwischen Fumarathydrase und Succinodehydrase an. Dieser gilt nicht nur für das Flavinenzym, sondern auch für das vom Träger gelöste Flavin. Wohl konnte mittels Dihydrolactoflavin auch über Succinodehydrase eine Hydrierung der Fumarsäure erreicht werden; die Reaktionsgeschwindigkeit war aber im Vergleich zu der der Fumarathydrase nur außerordentlich gering. Bezogen auf gleiche Wirksamkeit beider Fermente Leukomethylenviolett gegenüber, ergab sich, daß Succinodehydrase diese Wasserstoffübertragung etwa 30 bis 40 mal langsamer katalysiert als Furmarathydrase.

G. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden Beobachtungen aufgezeigt, die eine künstliche Umbildung der Succinodehydrase in Fumarathydrase, wenigstens was die Hefe anlangt, wahrscheinlich machen. Auch am tierischen Gewebe fanden sich Andeutungen eines derartigen Überganges. Die Versuchsergebnisse, welche diese Annahme nahe gelegt haben, waren kurz zusammengefaßt die folgenden: Im tierischen Gewebe konnte neben der sehr aktiven Succinodehydrase kein Ferment von den besonderen Eigenschaften der Fumarathydrase nachgewiesen werden. Auch in Hefe wurde die Anwesenheit einer Succinodehydrase mit Sicherheit festgestellt. Sie war strukturgebunden und sehr empfindlich allen äußeren Einflüssen gegenüber. Eine starke Fumarsaure hydrierende Wirkung der Hefe erwies sich gleichfalls als fixiert, aber stets als die stabilere der beiden fermentativen Fähigkeiten. Nur ein geringer Bruchteil von ihr konnte in lösliche Form gebracht werden. Die so

erhaltene Fumarathydrase war keinesfalls „ideal". Sie konnte aber durch weitere chemische Einflüsse von Bernsteinsäure dehydrierender Wirkung frei gemacht werden.

Dazu kam eine bereits bekannte, bisher aber nur schwer zu deutende weitere Tatsache. Fumarsäure wird, im Gegensatz zu den anderen untersuchten Äthylenkörpern nicht von lebender, wohl aber von abgetöteter Hefe und daraus isolierten Fermentlösungen hydriert[10]). Soweit die experimentellen Befunde! Es lassen sich aber auch noch andere Gründe zur Rechtfertigung dieser Theorie anführen. Daß bei der Aufgabe der natürlichen Zellgebundenheit eines Fermentes ebenso wie bei der Abspaltung der prostethischen Gruppe Potentialverschiebungen nach der negativen Seite eintreten können, wurde am Beispiel des Cytochroms c bewiesen[50]). Für Succinodehydrase ($E_0' = \pm 0{,}00$ Volt) scheint die Loslösung von der Zellstruktur gleichfalls mit einer Verminderung des Potentials verbunden zu sein, wodurch das Ferment die typischen Eigenschaften der Fumarathydrase (scheinbares Potential $E_0' = -0{,}15$ Volt) annimmt. Seine katalytischen Fähigkeiten sind damit enger umgrenzt worden. Irreversibilität der Fermentwirkung und die bekannte Unfähigkeit der Fumarathydrase, weniger stark negative Leukofarbstoffe zu dehydrieren, lassen sich so verstehen. Bei allen Unterschieden der beiden Fermente bleiben aber doch noch gewisse gemeinsame Merkmale bestehen. So fällt auf, daß das optimale Aciditätsgebiet der Fumarathydrase sich nur wenig von dem der Succinodehydrase unterscheidet[3]). Auch die kinetischen Verhältnisse zeigen außergewöhnliche Übereinstimmung, entfalten doch beide Fermente bereits bei minimaler Substratkonentration eine optimale Wirkung. Mit Rücksicht darauf, daß derartige Reaktionen vom sog. Nulltypus in der Fermentchemie nur selten angetroffen werden, verdient gerade dieser Umstand als verknüpfendes Band der beiden Enzyme eine besondere Beachtung. Lediglich in einem wichtigen Punkt scheint ein Gegensatz der beiden Fumarsäure hydrierenden Fermente von vorneherein zu bestehen. Die Untersuchungen sowohl von Hopkins[51]) als auch die von Euler und seinen Mitarbeitern[52]) haben es wahrscheinlich gemacht, daß bei der Succinodehydrase eine SS oder SH Konfiguration als prosthetische Gruppe wirkt. Die prosthetische Gruppe der Fumarathydrase hingegen ist Alloxazin-Adenin-dinucleotid. Sie hat also mit Sulfhydrilgruppen sicherlich nicht das mindeste zu tun. Vorläufige Versuche, einerseits das Dinucleotid auch für die Wirkung der Succinodehydrase verantwortlich zu machen, oder andererseits die Succinatwirkung der Fumarathydrase durch reduziertes Glutathion oder Natriumhyposulfit wiederherzustellen, waren jedenfalls erfolglos.

Ein positiver Ausfall der zuletzt genannten Versuche wäre gleichbedeutend mit einem strengen Beweis der hier entwickelten Theorie. Mit den Erkenntnissen dieser Arbeit wäre dann ein tieferer Einblick

in die Natur der ihrer Zellgebundenheit wegen derartigen Analysen selbst nicht zugänglichen Succinodehydrase gewonnen worden.

Das Problem Fumarathydrase-Succinodehydrase hat eine der wichtigsten Grundfragen der Enzymforschung berührt. Diese oft gestellte Frage lautet: Was kann man überhaupt aus den Eigenschaften eines isolierten und weitgehend gereinigten Fermentes über die katalytischen Fähigkeiten aussagen, die es durch seine Verankerung in der Zelle erlangt?

Es wäre jedenfalls gut denkbar, daß das, was man in vitro als den Wirkungsbereich eines Fermentes erkennt, häufig nur Bruchstücke dessen sind, was es in Wirklichkeit leistet. Die Vorgänge der Autolyse, die einer Löslichmachung sehr vieler Enzyme vorangehen müssen, sind zweifellos mit einem Abbau von Trägersubstanzen verbunden, deren Anwesenheit gerade eine gesteigerte und auch vielseitigere Leistungsfähigkeit der Fermente mit sich bringen könnte. Lediglich bei den schon in der intakten Zelle löslich vorhandenen Lyoenzymen, deren Isolierung unter Umständen in unverändertem Zustand erfolgen kann, dürften derartige Erwägungen weniger in Betracht zu ziehen sein.

Irgendwelche Untersuchungen über den Aufbau fixierter Fermente sind im allgemeinen unmöglich. Lediglich ihre Wirkungen können studiert werden. Die aus ihnen hervorgehenden löslichen Fermente sind weitgehend stabilisiert und Reinigungen zugänglich. Ihr Aufbau, ihre prosthetischen Gruppen können identifiziert werden, aber ihre Wirkungen werden im allgemeinen kein wahres Bild von dem Können geben, das sie mit der Loslösung von der Struktur verloren haben.

Sollten die Eigenschaften der Fumarathydrase sich nun wirklich einmal einwandfrei als die einer künstlich entarteten Succinodehydrase identifizieren lassen, so könnte von einer physiologischen Bedeutung dieses Fermentes im normalen Leben der Zelle wohl kaum mehr die Rede sein. Der hier geschilderte Fall würde aber wahrscheinlich nicht der einzige bleiben. Diaphorase, nach v. Euler[53]), nach Green Coenzymfaktor genannt[54]), ist ein an die Zellstruktur gebundenes Ferment, das ebenso wie die als gelbe Fermente charakterisierten löslichen Dihydropyridindehydrasen als unmittelbarer Wasserstoffüberträger zwischen Codehydrasen und Cytochrom wirkt, nur daß es diese Reaktion etwa 1000mal rascher katalysiert. Die Bedeutung der löslichen gelben Fermente im Leben ist mit dieser Feststellung in ähnlicher Weise erschüttert worden, wie die der Fumarathydrase. Es wäre also durchaus möglich, daß die beiden Dihydropyridindehydrasen löslich gewordene Bruchstücke dieser Diaphorase darstellen, die den Hauptteil ihrer katalytischen Fähigkeiten eingebüßt haben. H. Theorell betonte bereits früher ausdrücklich, daß das gelbe Ferment nur für einen geringen Teil der zwischen Codehydrasen und Cytochrom c stattfindenden Wasserstoffverschiebungen verantwortlich gemacht werden kann[55]).

Green und Dewar haben kürzlich das Vorkommen des gelben Fermentes im Tierkörper überhaupt in Frage gestellt[56]). Es ist daher kaum mehr verwunderlich, daß Scent-Györgyi den Platz des gelben Fermentes in seinem Atmungsschema neuerdings durch Diaphorase ersetzt hat[57]). Dieses fixierte Ferment scheint in der Tat alles das zu leisten, was man dem gelben Ferment bisher vergeblich nachweisen wollte. Daß der Coenzymfaktor frei sein soll von Flavin, ist kein Beweis gegen die Richtigkeit der an diesem Beispiel so plausiblen Entartungstheorie; daß er beim Trocknen der Hefe zerstört wird, spricht hingegen sehr dafür. Da Szent-Györgyi und seine Mitarbeiter in allerjüngster Zeit die Diaphorase als ein Alloxazin-Proteid gekennzeichnet haben[57]), ist der hier diskutierte Übergang des fixierten in ein lösliches gelbes Ferment bis zu einem gewissen Grade schon bewiesen worden. Die Umwandlung Succinodehydrase ⟶ Fumarathydrase und vielleicht auch die Zugehörigkeit der Succinodehydrase zu den Flavoproteinen ist damit wahrscheinlicher gemacht worden.

EXPERIMENTELLES.

A. Methodik der Wirksamkeitsbestimmung.

Zur Auswertung der verschiedenen Fermentlösungen wurden die im folgenden näher beschriebenen Methoden benützt.

1. Bestimmung der Fumarathydrasewirksamkeit.

Eine quantitative Bestimmung der Fumarathydrase[3]) beruht darauf, daß Leukofarbstoffe von einem Redoxpotential niedriger als $E_0' = -0{,}12$ Volt imstande sind, ihren Wasserstoff über Fumarathydrase auf Fumarsäure zu übertragen. Als geeigneter Farbstoff wurde Methylenviolett ($E_0' = -0{,}256$ Volt) verwendet. Der Reaktionsverlauf ist dann folgender:

$$\text{Leukomethylenviolett} + \text{Fumarsäure} \xrightarrow[\text{Fumarathydrase}]{\text{Fumarat-}} \text{Methylenviolett} + \text{Bernsteinsäure}$$

Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist von der Fumarsäurekonzentration unabhängig und bei gegebener Anfangskonzentration an Leukofarbstoff einzig und allein durch die Menge des Wasserstoff übertragenden Fermentes bestimmt. Da der Übergang des Leukofarbstoffes in seine oxydierte Form mit dem Auftreten einer intensiven, roten Farbe verbunden ist, kann die Aktivität des Fermentes leicht nach der Schnelligkeit der Rotfärbung beurteilt werden.

Ausführung einer Messung: In ein Thunbergrohr werden einpipettiert 1,0 ccm m/5000 Methylenviolettfärbung, 0,1 ccm m/10 Kaliumfumaratlösung, ein bestimmtes Volumen der Fermentlösung (0,1 bis 0,4 ccm) und soviel m/5 Phosphatpuffer pH 7, daß das Gesamtvolumen 2 ccm beträgt. Dann wird zur Verdrängung der Luft kurze Zeit Kohlendioxyd eingeleitet und soviel Natriumhyposulfitlösung zugetropft, bis der Farbstoff gerade eben quantitativ reduziert ist. Ein Überschuß an Hyposulfit ist, da er Fermentschädigungen mit sich bringen kann, unbedingt zu vermeiden. Das Thunbergrohr wird nun verschlossen, durch schlagartiges Evakuieren an der Wasserstrahlpumpe von den letzten Spuren Luft befreit, und in einen beleuchteten Thermostaten von 30° C gesetzt. Die Wiederkehr der roten Farbe wird mit einer Skala von 5 Röhren verglichen, die einer 10 bis 50%igen

Wiederfärbung entsprechen. Die Zeit, die zwischen den Farbstufen 1 und 5 vergeht, wird mit der Stoppuhr gemessen und stellt ein unmittelbares Maß dar für die Aktivität der Fermentlösung. Man berechnet dann die Anzahl x der Fermenteinheiten einer unbekannten Lösung nach der Formel $x = \frac{A \cdot a}{B \cdot b}$ wobei A bedeutet die Wiederfärbungszeit für a ccm der Vergleichsrohfermentlösung und B die für b ccm der zu bestimmenden Lösung. Haben z. B. 0,2 ccm der Rohfermentlösung eine Wiederfärbungszeit von 80 Sekunden und 0,4 ccm der unbekannten Lösung eine solche von 160 Sekunden, so enthält diese Lösung

$$x = \frac{80 \cdot 0{,}2}{160 \cdot 0{,}4} = 0{,}25 \text{ Fumarathydraseeinheiten.}$$

In den Versuchen mit pflanzlichen und tierischen Extrakten ist die Reoxydation wegen der Eigenfarbe und leichten Trübung der Fermentlösungen oft nur ungenau mit den Farbstufen der Skala zu vergleichen. Um den Fehler möglichst klein zu halten, wird in solchen Fällen den Vergleichsröhren durch Zusatz einer äquivalenten Menge der Extrakte ein ähnlicher Farbton verliehen.

2. Bestimmung der Flavinenzymwirksamkeit.

Da die übrigen gelben Fermente in dem als Ausgangsmaterial dienenden Rohferment nicht enthalten sind, kam lediglich eine Bestimmung der beiden Dihydropyridindehydrasen in Frage. Man bedient sich hierzu nach O. Warburg [5]) des folgenden Systems:

$$\text{Hexosemonophosphorsäure (Robisonester)} \xrightarrow{2H} \text{Robisonesterdehydrase (Zwischenferment)} \xrightarrow{2H}$$

$$\text{Codehydrase II} \xrightarrow{2H} \text{Flavinenzym} \xrightarrow{2H} \begin{cases} \nearrow \text{Sauerstoff} \\ \searrow \text{Methylenblau} \end{cases}$$

Sind die zum Ablauf dieser Reaktion notwendigen Zwischenglieder (Robisonesterdehydrase, Codehydrase II) in genügendem Überschuß vorhanden, so ist bei gegebener Sauerstoffkonzentration und konstantem Anfangsdruck des Sauerstoffs, bzw. konstanter Anfangskonzentration an Farbstoff, der Gehalt an gelbem Ferment allein geschwindigkeitsbestimmend. Die Abnahme des Sauerstoffdruckes, die in bestimmten Zeitabständen in der Warburgapparatur gemessen wird, oder die Entfärbungszeit von Methylenblau stellt ein unbedingtes Maß für den Flavienzymgehalt der Ansätze dar.

Für Serienversuche besser geeignet, aber weniger genau ist die Methylenblautechnik. Sie wurde der Einfachheit halber fast stets zu den Wirksamkeitsbestimmungen herangezogen.

Da Robisonester nur sehr schwer zugänglich ist, und die Darstellung der für ihn spezifischen Codehydrase II erheblichen Schwierigkeiten begegnete, wurde von Anfang an der leicht erhältliche Neubergester und die zu dessen Dehydrierung notwendige Cozymase verwendet. Ein Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten mit ein und demselben gelben Fermentpräparat in den 3 Systemen

Neubergester, Dehydrase, Codehydrase I, Flavinenzym, Methylenblau
Neubergester, Dehydrase, Codehydrase I, Flavinenzym, Sauerstoff
Robisonester, Dehydrase, Codehydrase II, Flavinenzym, Methylenblau

zeigte eine gute Übereinstimmung. Neubergester wird bei Vermittlung des Wasserstofftransportes durch die geiche Menge Flavinenzym ebenso rasch dehydriert, wie Robisonester. Die aus der Methylenblauentfärbung berechnete Sauerstoffaufnahme betrug 22 cmm in 5 Minuten, während 17 cmm gemessen wurden. Das gelbe Ferment reagiert also, in Übereinstimmung mit den Beobachtungen Warburgs [5]) mit Sauerstoff etwas langsamer als mit Methylenblau.

Der Gang einer Flavinenzymbestimmung wird aus den Werten der Tabelle 1 deutlich, in der die Zusammensetzung des Thunbergrohrinhaltes und die entsprechende Entfärbungszeit wiedergegeben ist. Jedes Rohr enthält insgesamt 1,5 ccm Flüssigkeit. Die Temperatur beträgt 30° C. Da die Wirksamkeit der Codehydrase- und der Zwischenfermentlösung, je nach geringfügigen Zufälligkeiten der Darstellungsweise mitunter sehr schwankend ist, muß die notwendige Menge dieser Komponenten vor jeder Bestimmung neu festgelegt werden. Dies geschieht, indem man ihre Konzentration bei gleich bleibendem Gehalt an Rohferment so lange variiert, bis eine möglichst rasche Entfärbung erreicht wird (Nr. 1—3). Sodann werden die Zeiten mit bestimmten Mengen unbekannter Flavinenzymlösungen gemessen (Nr. 4—5). Schließlich ermittelt man in einer Verdünnungsreihe mit der Vergleichsrohrfermentlösung die den unbekannten Flavinenzymmengen entsprechenden Entfärbungszeiten (Nr. 6—10). Die Anzahl der Fermenteinheiten berechnet sich dann nach der Formel $x = \frac{a}{b}$ wobei a die Anzahl ccm Vergleichsrohfermentlösung 1 : 10 ist, die die gleiche Entfärbungszeit hervorrufen wie b ccm der untersuchten Lösung.

Lösung 1 enthält demnach $x = \frac{0{,}03}{0{,}1} = 0.33$ Einheiten und Lösung 2 dementsprechend $x = \frac{0{,}05}{0{,}02} = 2{,}5$ Einheiten Flavinenzym.

Hemmung des Systems durch Sulfationen. Gereinigte Präparate von gelbem Ferment zeigten im System der Neubergesterdehydrierung mit Methylenblau als Akzeptor oft eine viel geringere

Tabelle 1.

Nr.	Phosphatpuffer m/5 p_H 7 ccm	Neubergester ccm	Cozymaselösung ccm	Zwischenferment ccm	Gelbes Ferment ccm	Methylenblau m/1000 ccm	Zeit
1	0,90	0,1	0,05	0,1	0,1 roh 1 : 10	0,25	15‘
2	0,75	0,1	0,1	0,2	0,1 roh 1 : 10	0,25	6‘
3	0,65	0,1	0,2	0,2	0,1 roh 1 : 10	0,25	3‘ 3‘30“
4	0,65	0,1	0,2	0,2	0,1 Lsg 1	0,25	8‘ 9‘
5	0,80	0,1	0,2	0,2	0,02 Lsg 2	0,25	5‘30“ 6‘
6	0,80	0,1	0,2	0,2	0,05 roh 1 : 10	0,25	5‘30“ 6‘
7	0,80	0,1	0,2	0,2	0,03 roh 1 : 10	0,25	8‘30“
8	0,85	0,1	0,2	0,2	0,01 roh 1 : 10	0,25	14‘ 15‘
9	0,85	0,1	0,2	0,2	0,05 roh 1 : 100	0,25	19‘ 20‘
10	0,85	0,1	0,2	0,2	—	0,25	32‘ 34‘

Wirksamkeit als rein äußerlich nach der Intensität ihrer gelben Farbe vermutet werden konnte. Dialysiert man derartige Lösungen längere Zeit bei 0° gegen fließendes destilliertes Wasser, so steigt ihre Wirksamkeit bis zu dem erwarteten Grad an. Ursache dieser Hemmungserscheinungen ist der Gehalt der Fermentpräparate an Ammoniumsulfat, das ihnen vom Gange ihrer Reinigung her anhaftet und bei der Dialyse entfernt wird. Setzt man den Ansätzen mit Rohferment Ammoniumsulfat in steigender Konzentration zu, so beobachtet man schon bei einem Salzgehalt von 1% eine Verlängerung der Entfärbungszeit auf mehr als das Doppelte. Wenn die Konzentration des Ammoniumsulfats etwa 8% beträgt, bleibt der Farbstoff völlig unangegriffen. Die hemmende Wirkung erwies sich als eine allgemeine Eigenschaft der Sulfationen. Für die Bestimmung der Flavinenzymwirksamkeit ist diese Beobachtung von großer praktischer Bedeutung. Alle zum Test benutzten Lösungen müssen unbedingt frei sein von Sulfationen.

3. Bestimmung der Succinodehydrasewirksamkeit.

Die Bestimmung der Succinodehydrase erfolgte in Thunbergrohren mit Methylenblau als Akzeptor. Das pH Optimum dieser Reaktion wurde von K. Laki [58]) zu 8,75 bestimmt. Die Entfärbung von Methylenblau verläuft in Anwesenheit von Succinat und Succinodehydrase bei pH 8,75 tatsächlich 3mal rascher als bei pH 7. Die einzelnen Ansätze enthalten daher neben 0,2 ccm m/10 Natriumsuccinat 0,1 bis 0,4 ccm Fermentlösung und 0,25 ccm m/1000 Methylenblau, stets noch so viel m/5 Boratpuffer vom pH 8,75, daß das Gesamtvolumen 2 ccm beträgt.

Die Entfärbungszeit von Methylenblau ist allein bestimmt durch die Konzentration der Succinodehydrase. Die Wirksamkeit dieses Fermentes wird umgerechnet in Mole übertragenen Wasserstoffs pro Minute und so mit den Werten der Fumarataktivität verglichen.

B. Versuche zur Trennung von Fumarathydrase und Flavinenzym.

1. Gewinnung der Ausgangsmaterialien und Hilfsmittel.

Die zum Test und zu den Trennungsversuchen notwendigen Präparate wurden in folgender Weise dargestellt:

1. Trockenhefe: Frische untergärige Hefe wurde anfangs von der Brauerei Ganter Freiburg i./Br., später von der Bürgerbrauerei Würzburg bezogen, sorgfältig ausgewaschen, abgepreßt und in dünnen Schichten bei etwa 30^0 an der Luft getrocknet.

2. Macerationssaft: wird gewonnen, indem Trockenhefe mit der dreieinhalbfachen Gewichtsmenge Wasser bei 35° etwa 3 bis 4 Stunden im Brutschrank belassen wird. In der klar zentrifugierten tiefbraunen Lösung ist die Fumarathydrase nur begrenzte Zeit haltbar. Trocknet man den Saft im Vakuum ein, so lassen sich sehr dauerhafte Präparate gewinnen. Die Untersuchung eines von Buchner im Jahre 1899 dargestellten Trockenpulvers dieser Art ergab jedenfalls noch eine sehr hohe Fumarathydraseaktivität.

3. Essigesterautolysate: werden durch etwa 12stündiges Rühren von 4 Gewichtsteilen frischer Preßhefe mit einem Gewichtsteil Essigester bei Zimmertemperatur erhalten. Bei kurz dauernder Plasmolyse mit Essigester wird keine Fumarathydrase von der Hefezelle losgelößt.

4. Gelbes Rohferment: wurde als Dauerpräparat nach den für Fumarathydrase verbesserten [3]) Warburg'schen Angaben aus Trokkenhefe dargestellt. Fumarathydrase- und Flavinenzymwirksamkeit

sind im Trockenpräparat jahrelang, in Rohfermentlösungen bei 0° mindestens 14 Tage unverändert haltbar.

5. Zwischenfermentpräparate: Die zu den Messungen nötigen Zwischenfermentlösungen sollten nach Möglichkeit frei sein von gelbem Ferment. Präparate, die dieser Anforderung hinreichend genügten, wurden erhalten nach O. Warburg und W. Christian durch Kohlensäurefällung von Macerationssaft [5]). Das rohe Zwischenfermentpräparat aus Hefe ist im System der Neubergesterdehydrierung ebenso gut wirksam wie in dem der Robisonesterdehydrierung. Sein geringer Gehalt an gelbem Ferment macht sich nur bei der Bestimmung kleinster Flavinenzymmengen störend bemerkbar. Die Grenze der Bestimmbarkeit liegt ungefähr bei einer Fermentkonzentration von 0,01 Einheiten, dem Eigenflavinenzymgehalt der Zwischenfermentpräparate. Seiner einfachen Darstellungsweise wegen vorzuziehen, ist Zwischenferment aus Bohnen, das durch Extraktion von Bohnenmehl mit verdünnten sekundären Natriumphosphatlösungen erhalten werden kann [59]). Das Präparat dehydriert Neubergester rasch, erhält aber keine Robisonesterdehydrase. Der Gehalt an Flavinenzym ist je nach der Vorbereitung des Bohnenmehles etwas schwankend, aber stets viel geringer als Wagner-Jauregg und Rauen angeben. Die Entfärbungszeit von Methylenblau beträgt im Durchschnitt 3 Minuten mit, gegen 40 Minuten ohne gelbes Ferment, während die genannten Autoren ein Zeitverhältnis von 6 gegen 15 Minuten gefunden haben. Unterschiede dieser Art sind durch das Alter der Bohnen bestimmt, das eine Zerstörung des Flavinenzyms unter Erhaltung der Dehydrasen mit sich bringt.

6. Codehydrasepräparate: Reine Cozymase wurde nach der Methode von H. v. Euler, H. Albers und F. Schlenk [60]) als weißes Trockenpulver erhalten und in Lösung (1 mg pro ccm) verwendet. Die Reinigung dieses Präparates braucht nicht unbedingt bis zur letzten Stufe durchgeführt zu werden. Meistens wurde die nach der Zerlegung der Phosphorwolframsäurefällung erhaltene Lösung (Lösung c) im Vakum bei 30° eingeengt, zu den Testversuchen verwendet. Dieses Präparat enthält hauptsächlich Codehydrase I, daneben aber auch noch genügend Codehydrase II, sodaß es ohne weiteres auch im System der Robisonesterdehydrierung verwendet werden kann. Versuche, ein wirksames Präparat von Codehydrase II nach O. Warburg und W. Christian aus Pferdeblut zu gewinnen [61]), waren erfolglos.

7. Robisonester: wurde nach der von Warburg und Christian [62]) modifizierten Robison'schen Methode [63]) aus Glucose und Phosphat unter der Einwirkung von Macerationssaft dargestellt, und als Bariumsalz isoliert.

8. Neubergester: ist nach C. Neuberg [64]) aus Candiolin erhältlich. Hierbei ist zur Überführung des Bariumsalzes in das Kaliumsalz ein Überschuß von Kaliumsulfat peinlichst zu vermeiden, da das dehydrierende Fermentsystem durch Sulfationen stark gehemmt wird.

2. Chloroformbehandlung.

Die Rohfermentlösungen wurden mit variierten Mengen Chloroform und einigen Tropfen Octanol 4 bis 20 Stunden lang im Thermostaten bei 36° geschüttelt, und vom ausgeschiedenen Eiweiß abzentrifugiert. Tabelle 2 zeigt einen Vergleich der Wirksamkeit vor und nach der Behandlung.

Tabelle 2.

Nr.	Fermentlösung	Menge $CHCl_3$	Versuchs-dauer	Fumarathydrase-einheiten vorher	nachher
1	20 ccm roh 1 : 20	0,25 ccm	4 Std.	0,50	0,25
2	20 ccm roh 1 : 20	0,5 ccm	20 Std.	0,50	0,10
3	16 ccm roh 1 : 20	0,2 ccm	8 Std.	0,50	0,40
4	16 ccm roh 1 : 20	0,5 ccm	18 Std.	0,50	0,16
5	16 ccm roh 1 : 10	0,4 ccm	9 Std.	1,00	0,15
6	16 ccm roh 1 : 10	0,8 ccm	19 Std.	1,00	0,15

Mit Ausnahme von Versuch 3 war jedesmal eine starke Wirksamkeitsverminderung festzustellen, die im Höchstfall 85% betrug.

3. Essigesterbehandlung.

Ein Kilogramm frisch abgepreßter Hefe wurde mit 250 ccm Essigester versetzt und bei Zimmertemperatur unter häufigem Umrühren stehen gelassen. Nach 2 Tagen wurden noch 50 ccm Wasser zugegeben, nach 4 Tagen wurde zentrifugiert. Die erhaltenen 270 ccm Saft wurden nach der üblichen Vorschrift[3]) durch Fällung mit Bleiessig und Fraktionieren mit Aceton auf gelbes Rohferment weiterverarbeitet. Es wurden jeweils 3 g erste und zweite Acetonfraktion als Trockenpräparate isoliert. Die gewichtsmäßige Ausbeute ist, bezogen auf das Trockengewicht der Hefe kaum geringer als bei der Darstellung aus Macerationssaft. Einen Vergleich der Wirksamkeiten in beiden Testen zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3.

Präparat	Fermenteinheiten gelbes Ferment	Fumarathydrase	Wirksamkeitsverhältnis	
2. Acetonfraktion	1,00	0,27	4 : 1	zu Gunsten des gelben Fermentes.
1. Acetonfraktion	0,63	0,022	29 : 1	

4. Fällungsversuche mit Ammoniumsulfat.

a) Ausführung der Fällungen.

Bei Rohfermentlösungen wurde unter Eiskühlung das dem gewünschten Sättigungsgrad entsprechende Volumen einer bei Zimmertemperatur gesättigten Ammoniumsulfatlösung hinzugegeben. In gereinigten Fermentlösungen wurde jedoch, um eine allzu große Verdünnung zu vermeiden, die angegebene Sättigungskonzentration durch Einrühren von festem Ammoniumsulfat eingestellt. Die Ansätze blieben durchweg vor dem Abzentrifugieren etwa 10 Stunden bei 0° stehen.

b) Fällungsbedingungen der Fumarathydrase.

Bringt man Lösungen von Präparaten, die durch Adsorption gereinigt sind, mit 1 n Essigsäure auf pH 5,2 und setzt Ammoniumsulfat entsprechend einer Sättigungskonzentration von 66% zu, so findet man in der überstehenden Lösung keine Fumarathydrase mehr. Die wieder aufgelöste Fällung enthält aber im allgemeinen nicht mehr als 52 bis 62% der eingesetzten Wirksamkeit. Bei pH 7 beginnt das gereinigte Ferment bereits bei einem Sättigungsgrad von 50% auszufallen. Bei 55% Sättigung lassen sich dann 14%, bei 66% Sättigung zwischen 77 und 85% des Fermentes im wiedergelösten Niederschlag nachweisen. Am günstigsten sind die Ergebnisse in Lösungen, deren pH mit 1 n Ammoniak auf 9 eingestellt war. Man findet bei 66% Sättigung zwischen 93 und 97% des Fermentes im wieder aufgelösten Niederschlag. Da die Restlösungen der Fällungsversuche innerhalb des pH Bereiches von 5.2 bis 9 in jedem Fall so gut wie inaktiv waren, kann gefolgert werden, daß ein Sättigungsgrad von 66% für dieses pH Gebiet zwar ausreicht, daß aber bei pH 5,2 starke und pH 7 geringe Fermentverluste bei der Fällung auftreten. Beim Rohferment sind nun die Fällungsgrenzen für Ammoniumsulfat den gereinigten Lösungen gegenüber nach oben verschoben. Eine 50%ige Sättigung mit Ammoniumsulfat bewirkt in Rohfermentlösungen bei pH 7 noch keinerlei Fällung. Bei 60% Sättigung entsteht ein Niederschlag, der als Fumarathydrase unwirksam ist. Ein Sättigungsgrad von 66% ergibt bei pH 7 nur etwa 50% und ein solcher von 70% erst 76% des Fermentes in der wiedergelösten Fällung. Der übrige Fermentanteil ist diesmal aber in den Restlösungen nachweisbar. Ein Sättigungsgrad von 66% reicht also bei pH 7 im Gegensatz zu den Versuchen mit gereinigten Lösungen bei weitem nicht zur Fällung der Fumarathydrase aus. Die Ausfällung wird jedoch vollständig, wenn bei der gleichen Sättigungskonzentration ein pH von 5,2 eingestellt wird. Bei dieser Acidität findet man schon bei 60% Sättigung ungefähr 70% des Fermentes im Niederschlag, der dann bei 66% Sättigung ungefähr 90% des Fermentes enthält. Das rohe Präparat ist also offenbar schwach sauren Ammoniumsulfatlösungen

gegenüber viel weniger empfindlich als das gereinigte. Erst bei einem pH von 4,6 zeigen sich auch beim Rohferment ähnliche Fermentverluste, wie sie in reineren Lösungen bereits bei pH 5,2 beobachtet wurden. Sogar eine 85%ige Sättigung führt dann zu Niederschlägen, in denen nicht mehr als 65% des Fermentes wiedergefunden werden. Die fehlenden 35% der Fumarathydrase können in der Restlösung nicht nachgewiesen werden.

5. Adsorptionsversuche mit Aluminiumhydroxyd Cγ.

Versuch 1. 10 g Rohferment in 100 ccm Wasser wurden 40 Stunden bei 2 Grad dialysiert (1. Dialyse) und aus ganz schwach Phosphathaltiger Lösung an Aluminiumhydroxyd Cγ (2,5 g Trockensubstanz in 100 ccm der Suspension), das in 3 Portionen zugegeben war, adsorbiert. Eluiert wurde 3 mal mit einem Gemisch von sekundärem Ammoniumphosphat und Ammoniak. Die vereinigten Elutionen (1. Elution) wurden nach 48 stündiger Dialyse (2. Dialyse) zum zweiten mal unter denselben Bedingungen adsorbiert und eluiert (2. Elution). Nach erneuter 40 stündiger Dialyse (3. Dialyse) wurde die Lösung mit 1 n Essigsäure auf pH 5,2 gebracht und zweimal durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigungskonzentration von 66% umgefällt. Die wiedergelöste Fällung wurde nach 24 stündiger Dialyse (4. Dialyse) zum dritten Male adsorbiert.

Tabelle 4.

Reinigungsstufe der Präparate	Volumen in ccm	Fumarathydrase-einheiten	Ausbeute im ganzen	Ausbeute bezogen auf die vorige Stufe
Ausgangslösung roh	100	1,00	—	—
1. dialysierte Lsg.	110	0,90	100%	100%
1. Elution	125	0,73	90%	90%
2. dialysierte Lsg.	135	0,54	72%	80%
2. Elution	110	0,48	53%	74%
3. dialysierte Lsg.	120	0,33	40%	75%
gelöste Fällungen	18	0,91	16%	40%
4. dialysierte Lsg.	22	0,33	7%	44%
3. Elution	20	0,21	4%	57%

Versuch 2. 20 g Rohferment werden mit 200 ccm Wasser verrührt. Nach dem Zentrifugieren wäscht man mit 50 ccm Wasser nach. Zur vollständigen Adsorption sind insgesamt 200 ccm Cγ Aufschlämmung nötig, die in 3 Portionen von 100, 50 und 50 ccm zugegeben werden. Nach jeder Zugabe wird vor dem Zentrifugieren etwa 15 Minu-

ten unter Eiskühlung gerührt. Eluiert wird erst mit 100, dann mit 80, 60 und 50 ccm einer Lösung von m/10 sekundärem Natriumphosphat. Die vierte Elution ist fast farblos und nur noch sehr schwach wirksam. Die vereinigten Eluate werden bei 0—2° etwa 12 Stunden im Rührdialysator (Beschreibung des Apparates siehe Seite 44) von der Hauptmenge des Phosphats befreit, wozu etwa 20 Liter destilliertes Wasser nötig sind. Die unter diesen Bedingungen erhaltene Lösung (Lösung 1) zeigt noch einen schwachen Phosphatgehalt, der mit Magnesiamixtur als geringe Trübung nachgewiesen werden kann. Sie wird einer zweiten Adsorption unterworfen, bei der aber nur 60, 30 und 15 ccm Cγ verwendet werden. Die Restlösung der zweiten Adsorption (Lösung 2) enthält fast die Hälfte der Fumarathydrase, während der größte Teil des gelben Fermentes bereits im Adsorbens steckt. Indem man dieses mit 80, 65, 50 und 30 ccm m/10 sek. Natriumphosphatlösung eluiert, ergibt sich ein Präparat, das nach 12 stündiger Dialyse umgekehrt eine Verschiebung der Wirksamkeit zu Gunsten des gelben Fermentes zeigt (Lösung 3). Diese Lösung wird durch Zugabe von 1 n Essigsäure auf pH 5.2 gebracht und mit Ammoniumsulfat bei einer Sättigungskonzenttration von 66% gefällt. Dabei verstärkt sich die Verschiebung nach der Wiederauflösung und dem Wegdialysieren des Ammoniumsulfates beträchtlich (Lösung 4). Das Präparat wird nun noch zweimal unter den gleichen Bedingungen mit Ammoniumsulfat umgefällt. Bleibt die Fällung sodann etwa 6 Wochen in der Ammoniumsulfathaltigen Lösung im Eisschrank stehen, so löst sie sich in Wasser nur noch teilweise auf und liefert bei der darauffolgenden Dialyse gegen fließendes destilliertes Wasser einen ziemlich dicken Niederschlag. Die klar zentrifugierte Lösung (Lösung 5) ist sehr stark gelb, praktisch frei von Fumarathydrase und im System der Neubergerdehydrierung sehr aktiv. Die Wirksamkeitsverhältnisse und Ausbeuten sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5.

Präparate	Vol. in ccm	Fermenteinheiten Fumarathydrase	Fermenteinheiten gelbes Ferment	Wirksamkeitsverhältnis FH : gF	Fermentausbeuten Fumarathydrase	Fermentausbeuten gelbes Ferment
Ausgangslsg.	250	0,67	0,75	1 : 1	—	—
Lösung 1	340	0,44	0,50	1 : 1	90%	90%
Lösung 2	350	0,19	0,062	3 : 1	40%	12%
Lösung 3	265	0,13	0,50	1 : 3,8	20%	70%
Lösung 4	70	0,18	1,00	1 : 5,4	—	42%
Lösung 5	21	0,018	3,00	1 : 165	—	34%

Versuch 3. 40 ccm Rohfermentlösung 1 : 10 werden erst mit 20, dann mit 15 und 10 ccm Cγ adsorbiert und 4mal mit je 35 ccm m/5 Kaliumfumarat vom pH 7.2 eluiert. Die vereinigten Elutionen sind

schwach gelb gefärbt (Lösung 1) und werden 24 Stunden bei 0° gegen 20 Liter stehendes destilliertes Wasser dialysiert (Lösung2). Aus dieser Lösung wird die Fumarathydrase zum zweiten Male adsorbiert, wozu etwa 25 ccm Cγ erforderlich sind. Zur Elution wird 3 mal mit je 25 ccm m/5 Kaliumfumaratlösung behandelt. Die vereinigten Eluate (Lösung 3) werden mit 1 n Ammoniak auf pH 9 gebracht und entsprechend 66% Sättigung mit Ammoniumsulfat gefällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und in destilliertem Wasser möglichst konzentriert wieder gelöst (Lösung 4).

Tabelle 6.

Präparate	Vol. in ccm	Fermenteinheiten Fumarat-hydrase	Fermenteinheiten gelbes Ferment	Wirksamkeits-verhältnis FH : gF	Fermentausbeuten Fumarat-hydrase	Fermentausbeuten gelbes Ferment
Ausgangslsg.	40	1,00	1,00	1 : 1	—	—
Lösung 1	150	0,20	0,08	2,5 : 1	75%	—
Lösung 2	150	0,12	0,08	1,8 : 1	45%	—
Lösung 3	75	0,10	0,03	5 : 1	19%	—
Lösung 4	17	0,41	0,07	6 : 1	17%	—

6. Die Bedingungen der Dialyse.

Sämtliche Dialysen wurden, um Wirksamkeitsverluste möglichst zu vermeiden bei 0—2° C ausgeführt, und zwar nach den folgenden Methoden:

a) Dialyse gegen stehendes destilliertes Wasser

für kleinere Ansätze. Die Fermentlösung wird in einen Cellophanschlauch gefüllt und in einen mit eiskaltem Wasser beschickten Stutzen von 10 Liter Inhalt eingehängt. Der Stutzen wird im Eisschrank aufbewahrt.

b) Dialyse gegen fließendes dest. Wasser

für größere Ansätze. Zur Aufnahme der Dialysierblase dient ein zylindrisches Glasgefäß von etwa 5—10 cm Durchmesser und 20—30 cm Länge, dem kurz unterhalb seines oberen Randes und unmittelbar über seinem Boden je ein kurzes 3 mm weites Glasrohr angeschmolzen ist. Am unteren Glasrohr tritt aus mehreren großen Vorratsflaschen von je 10 Liter Inhalt kommend, und durch ein System von Kühlschlangen auf ca 0° gebracht, destilliertes Wasser in das Glasgefäß ein, welches durch das obere Glasrohr wieder abgeleitet wird. Glasgefäß und Kühlschlangen werden in einem möglichst großen Bottich mit Eis-Wassermischung eingesetzt. Die Dialysierblase taucht man in das mit Wasser gefüllte Glasgefäß ein und befestigt sie an einem Stab, der als Achse eines elektromotorisch getriebenen Rades in vertikaler Lage gedreht wird und damit den Cellophanschlauch in ständiger rotierender Bewe-

gung hält. Der Ausfluß der Vorratsflaschen wird durch ihren Niveauunterschied dem Dialysiergefäß gegenüber bewirkt und mittels Quetschhahn so einreguliert, daß im Laufe von 12 Stunden etwa 30 Liter Wasser an der dialysierenden Lösung vorbeifließen. Unter diesen Bedingungen kann die Temperatur im Glasgefäß mühelos auf 0—2° C gehalten werden.

c) Die Elektrodialyse.

In einigen Fällen, besonders wenn es sich darum handelte, anorganische Salze möglichst rasch zu entfernen, kam auch die Elektrodialyse im Apparat von Pauli [65]) zur Anwendung. Der Apparat wurde durch Eintauchen in eine Eis-Wassermischung gekühlt. Die angelegte Spannung betrug 220 Volt, die Stromstärke 10 bis 20 Milliampere.

7. Vorschrift zur Darstellung von Fumarathydrase freiem gelbem Ferment.

Als Ausgangsmaterial für die Darstellung von Fumarathydrase freiem gelbem Ferment dient das aus Essigesterautolysaten erhaltene Rohferment (vgl. Seite 7), das bereits größtenteils von Fumarathydrase frei ist. 4,5 g dieses Präparates werden in 45 ccm Wasser gelöst und 72 Stunden im Rührdialysator dialysiert. Die klar zentrifugierte Lösung wird sodann mit 1 n Essigsäure auf p_H 5,2 gebracht und mit Ammoniumsulfat 66% Sättigung entsprechend gefällt. Der Niederschlag wird am folgenden Tage mit 20 ccm Wasser gelöst und die Lösung nochmals 48 Stunden gegen fließendes destilliertes Wasser dialysiert. Darauf wird die Ammoniumsulfatfällung unter den gleichen Bedingungen wiederholt. Den Niederschlag löst man in 16 ccm Wasser. Nach einer letzten 24 stündigen Dialyse enthält das Präparat (Volumen 10 ccm) 1,00 Einheiten gelbes Ferment und nur noch $18 \cdot 10^{-4}$ Einheiten Fumarathydrase. Das Wirksamkeitsverhältnis beträgt 555 : 1 zu Gunsten des gelben Fermentes, die Ausbeute 40%.

8. Elektrophoreseversuche.

a) Apparatur und Versuchsanordnung.

Die elektrophoretischen Versuche wurden bei verschiedenem p_H anfänglich im großen Kataphoreseapparat für präparative Zwecke [66]), später aber nur noch im kleinen Apparat für Untersuchungszwecke ausgeführt. Der große Aparat erwies sich bei den vorhandenen minimalen Abweichungen im elektrophoretischen Verhalten der beiden Fermente als vollkommen ungeeignet zur Trennung. Die verwendete kleine Apparatur war eine nach den Angaben von O. Meyerhoff und W. Möhle [12]) verbesserte Ausführung des Theorell'schen Modells [15]). Eine genaue Beschreibung des Apparates und seiner Handhabung findet man in diesen Arbeiten. Er besteht im wesentlichen aus einem U-Rohr, dessen Schen-

kel in jeweils 6 einzelne Kammern geteilt und durch ein U förmiges Zwischenstück miteinander verbunden sind. Die auseinandernehmbaren Teile des U-Rohres werden durch ein Messinggestell zusammengehalten. Zwischen den einzelnen Glaszellen sind, auf deren Schliffen durch Einfettung dicht schließend, kreisrunde Hartgummifolien angebracht, durch deren Drehung jeweils 2 Zellen miteinander in Verbindung gebracht oder von einander abgeschlossen werden können. Der Aufbau der Glaszellen erfolgt, anders als bei den genannten Autoren derart, daß die mit seitlichen Ansätzen versehenen Glasringe nicht in der Mitte des U-Rohres, sondern unmittelbar über dem U förmig gebogenen Verbindungsstück selber eingesetzt werden. Das U-Rohr wird dann bis zum oberen Rand der Zellen 6 + und 6 — mit der Fermentlösung beschickt, und im übrigen mit Pufferlösung aufgefüllt. Bei dieser Anordnung wird zweierlei erreicht; erstens eine Ersparnis an Ausgangsmaterial und zweitens eine Verfeinerung der Trennungsmöglichkeit, indem der Einwanderung des Fermentes 5 statt 3 Kammern zur Verfügung gestellt werden, was bei kleinen Unterschieden der Wanderungsgeschwindigkeiten sehr nützlich ist.

Da alle Versuche zur Vermeidung von Wirksamkeitsverlusten ohnehin bei 0° vorgenommen werden müssen, ist die Beschaffung eines kostspieligen Thermostaten unnötig. Der Apparat wird in einen versteiften Drahtnetzkorb eingesetzt und mit diesem an seinem Metallgestell in eine geräumige Glaswanne eingehängt. Der Raum zwischen dem Drahtnetz und der Wandung der Glaswanne wird mit Eisstücken beschickt. Das Innere des Korbes füllt man mit Wasser, das durch einen kräftigen, mit Elektromotor betriebenen Rührer in starker Bewegung und somit in ständigem Wärmeaustausch mit den Eisstücken jenseits des Drahtgitters gehalten wird. Auf diese Weise kann die Temperatur bei gelegentlichem Nachfüllen von Eis mühelos konstant auf 0° gehalten werden.

Voraussetzung zur Vermeidung von Grenzflächenstörungen bei der Elektrophorese ist, daß Leitfähigkeit und p_H Wert der Ferment- und Pufferlösung gut übereinstimmen. Die Messung der elektrischen Leitfähigkeit wurde in der Wheatstone'schen Brückenanordnung vorgenommen. Als Leitfähigkeitsgefäße dienten sog. Leitfähigkeitspipetten, die mit $^1/_{10}$ n KCl Lösung geeicht waren, und einen C-Wert von 0,1093 bezw. 0,0811 besaßen. Die Apparatur arbeitet mit einer Genauigkeit von 0,7%. Der p_H Wert der Lösungen wurde mit der Chinhydronelektrode potentiometrisch bis auf ± 0,01 Einheiten genau bestimmt.

Ausgangsmaterial für alle Versuche war das gelbe Rohferment. Die elektrische Leitfähigkeit einer Lösung 1 : 10 dieses Präparates in reinem Wasser $\varkappa = 2{,}0 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm und für eine Lösung 1 : 20 $\varkappa = 1{,}2 : 10^{-3}$ rez. Ohm. Ideal ist nach H. Theorell eine Leitfähigkeit von 1 bis $2 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm. Da das p_H der Fermentlösung durch Zugabe von Pufferlösung bei der Elektrophorese konstant zu halten ist, mußte

im allgemeinen eine etwas höhere Leitfähigkeit von 2 bis $3{,}5 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm in Kauf genommen werden. Die Leitfähigkeit kann etwas niedriger gehalten werden, wenn die Rohfermentlösung vor dem Versuch einer kurzen Elektrodialyse unterworfen wird, die das Ferment nicht schädigt und in 70 Minuten ein Absinken ihrer Eigenleitfähigkeit um $0{,}5 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm bewirkt.

Die Einstellung von Fermentlösung und Pufferlösung auf gleiche Leitfähigkeit und gleichen pH Wert geht nun in folgender Weise vor sich: Die Puffersubstanzen werden derart eingewogen, daß der gewünschte pH Wert und gleichzeitig eine Leitfähigkeit von 3 bis $4 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm erreicht wird. Die Rohfermentlösung 1 : 10 wird dann mit der Pufferlösung auf 1 : 20 verdünnt, wobei nötigenfalls nach Zugabe von etwas verdünnter Säure oder Lauge Übereinstimmung im pH Wert erzielt wird. Dann verdünnt man die Pufferlösung so lange, bis ihre Leitfähigkeit auf der Wert der Fermentlösung herabgesunken ist, wobei das pH, wenn die Verdünnung nicht allzu stark ist, konstant bleibt. Eine Abweichung der Leitfähigkeiten um 1% und eine Differenz der pH Werte um 0.03 Einheiten wurde als höchst zulässiger Fehler betrachtet.

b) Vorversuche über pH Beständigkeit.

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß die Wirksamkeit der gereinigten Fumarathydrase in Pufferlösungen bei 0^0 innerhalb des pH Bereiches von 5.2 bis 9 mindestens 3 Tage voll erhalten bleibt. Unterhalb pH 5,3 nimmt die Beständigkeit des Fermentes jedoch rasch ab. So findet man bei pH 4.8, noch 42% und bei pH 4.6 nach 7 Stunden nur noch 33% der ursprünglichen Wirksamkeit wieder. Die Abnahme der Aktivität wird durch Verdünnung der Lösung erheblich beschleunigt. Eine sehr verdünnte Rohfermentlösung 1 : 60 in Acetatpuffer vom pH 5,2 kann im Laufe von 24 Stunden bereits zur Hälfte inaktiviert werden. Kataphoreseversuche bei pH 4.6, wie sie von Theorell am gelben Ferment erfolgreich durchgeführt wurden, scheiden daher zur Reinigung der Fumarathydrase aus. Selbst bei pH 5.2 wird man noch mit geringen Verlusten an Fumarathydrase rechnen müssen.

c) Zusammenstellung der Versuchsdaten und Ergebnisse.

Die elektrophoretischen Versuche wurden zum Zweck der Trennung von Fumarathydrase und Flavinenzym durchgeführt. Eine exakte physikalische Messung der Innenbeweglichkeit war nicht beabsichtigt. Die aus den Versuchsdaten berechenbaren Ionenbeweglichkeiten weichen teilweise erheblich von den durch H. Theorell ermittelten Werten ab.

In den folgenden Tabellen sind die, nach Beendigung der Elektrophorese, in den einzelnen Zellen gefundenen Fermenteinheiten sowie die sonstigen Versuchsbedingungen zusammengestellt.

Versuch 1.

Anfangsgrenzschicht zwischen den Zellen 5 und 6
Fermentlösung: pH 5,24 $\varkappa = 3{,}64 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm
Acetatpufferlösung: pH 5,23—5,26; $\varkappa = 3{,}64 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm
Spannung 120 Volt; Stromstärke 12 mA; Zeit 10 Stunden

Tabelle 7.

Lösung	Vol. in ccm	Fermenteinheiten Fumarathydrase relativ	Fumarathydrase absolut	gelbes Ferment relativ	gelbes Ferment absolut
Ausgangslösung	31,5	0,44	13,86	0,40	12,60
U-Stück	27,5	0,25	6,60	0,40	8,25
Zelle 6+	2,0	0,24	0,48	0,40	0,80
Zelle 5+	2,0	0,26	0,52	0,40	0,80
Zelle 4+	2,0	0,27	0,54	0,40	0,80
Zelle 3+	2,0	0,20	0,40	0,40	0,80
Zelle 2+	2,0	0,12	+0,24	0,05	+0,10
Zelle 1+	2,0	—	—	—	—
			8,88		11,50
			Verlust 36%		Verlust 9%

Bei pH 5,24 findet eine langsame anodische Wanderung der beiden Fermente statt; die Zahlenwerte der Flavinenzymeinheiten lassen erkennen, daß diese Wanderung mit scharfen Grenzflächen und ohne Konzentrationsänderung verlaufen ist. 36% der Fumarathydrase sind, wahrscheinlich infolge der schwach sauren Reaktion, zerstört worden, ohne daß die geringste Trübung beobachtet wurde. Die Wanderungsgeschwindigkeiten der Fermente sind kaum verschieden. Der zurückgelegte Weg beträgt, da jede Zelle 1 cm Länge entspricht, für Fumarathydrase 3,5 cm, gegenüber 3,1 cm für gelbes Ferment. In Zelle 2 + kommt es daher zu einer geringen Verschiebung des Wirksamkeitsverhältnisses auf 2 : 1 zu Gunsten der Fumarathydrase.

Versuch 2.

Anfangsgrenzschicht zwischen den Zellen 5 und 6
Fermentlösung pH 6,87 $\varkappa = 1{,}77 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm
Phosphatpufferlösung pH 6,87 $\varkappa = 1{,}77 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm
Spannung 120 Volt; Stromstärke 8,8—9,6 mA. 10 Stunden.

Tabelle 8.

Lösung	Vol. in ccm	Fermenteinheiten Fumarathydrase relativ	Fumarathydrase absolut	gelbes Ferment relativ	gelbes Ferment absolut
Ausgangslösung	31,5	0,57	17,96	0,50	15,75
U-Stück	27,5	0,53	14,58	0,45	12,38
Zelle 6+	2,0	0,44	0,88	0,30	0,60
Zelle 5+	2,0	0,40	0,80	0,27	0,54
Zelle 4+	2,0	0,02	+0,04	—	+ —
			16,30		13,52
			Verlust 8%		Verlust 15%

Bei pH 6.87 hat sich der Unterschied in den Wanderungsgeschwindigkeiten der beiden Fermente gegenüber pH 5,2 verstärkt. Die absolute Wanderung der Fumarathydrase beträgt 0,74 cm, die des gelben Fermentes 0,54 cm. In Zelle 5 + zeigt sich daher auch eine geringe Verschiebung des Wirksamkeitsverhältnisses, die bei längerer Versuchsdauer wahrscheinlich sehr viel größer ausgefallen wäre.

Versuch 3a.

Anfangsgrenzschicht zwischen den Zellen 5 und 6
Fermentlösung pH 8,41 $\varkappa = 1{,}554 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm
Boratpufferlösung pH 8,41 $\varkappa = 1{,}557 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm
Spannung 240 Volt; Stromstärke 10 mA; Zeit 3,5 Std.

Tabelle 9.

Lösung	Vol. in ccm	Fermenteinheiten Fumarathydrase relativ	Fumarathydrase absolut	gelbes Ferment relativ	gelbes Ferment absolut
Ausgangslösung	31,5	0,49	15,44	0,30	9,45
U-Stück	27,5	0,41	11,28	0,27	7,43
Zelle 6+	2,0	0,47	0,94	0,27	0,54
Zelle 5+	2,0	0,33	0,66	0,23	0,46
Zelle 4+	2,0	0,32	0,64	0,15	0,30
Zelle 3+	2,0	0,33	0,66	0,15	0,30
Zelle 2+	2,0	0,32	0,64	0,15	0,30
Zelle 1+	2,0	0,32	+0,64	0,05	+0,10
			15,46		9,43
			kein Verlust		kein Verlust

Bei pH 8,41 ist eine rasche Wanderung der Fumarathydrase ohne jeden Verlust an Wirkung zu beobachten. Der Unterschied der Wanderungsgeschwindigkeit dem gelben Ferment gegenüber ist noch etwas größer als im neutralen Medium. In Zelle 1 + kommt es zu einer Wirksamkeitsverschiebung bis auf 6 : 1 zu Gunsten der Fumarathydrase. Aus der Konstanz des Fumarathydrasegehaltes in den Zellen 1 + bis 5 + ergibt sich, daß das Ferment mit scharfer Grenzfläche und ohne Konzentrationsänderung gewandert ist. Der Gehalt an gelbem Ferment ist in den Zellen 4 + 3 + und 2 + konstant, aber nur noch etwa halb so groß wie in den vorhergehenden Kammern. Daraus kann man schließen, daß das gelbe Ferment nicht einheitlich ist, sondern aus zwei Komponenten besteht, die beide im System der Neubergesterdehydrierung wirksam sind, aber im alkalischen Gebiet eine verschiedene Wanderungsgeschwindigkeit haben. Aus den Daten des Versuches x = Wanderung in cm; $\varkappa$ = Leitfähigkeit in rez. Ohm; q = Querschnitt des U-Rohres in qcm; i = Stromstärke in Ampère; t = Zeit in Sekunden berechnet sich die Ionenbeweglichkeit nach der Gleichung:

$$u = \frac{x \cdot \alpha \cdot q}{i \cdot t} \quad \frac{qcm}{Sek. \cdot Volt}$$

Für Fumarathydrase ergibt sich dann, da x = 3,3 cm beträgt: Ionenweglichkeit $u = \frac{3{,}3 \cdot 1{,}56 \cdot 10^{-3} \cdot 2{,}01}{0{,}010 \cdot 11600} = + 0{,}89 \cdot 10^{-4} \frac{qcm}{Volt \cdot sek.}$

In den folgenden Versuchen wurde, um eine bessere Trennung zu erreichen, die Fermentlösung auf der kathodischen Seite des U-Rohres und zwar in die Zelle 1— bis 5— eingefüllt. In alle übrigen Zellen und das U förmige Verbindungsstück wurde die Pufferlösung gegeben. Die spezifisch schwerere Fermentlösung sinkt dann allerdings innerhalb kurzer Zeit bis in die Mitte des U-Rohres herab, wobei sie sich stark verdünnt. Trotzdem wird die der Wanderung zur Verfügung stehende Wegstrecke auf etwa das 3 fache verlängert.

Versuch 3 b.

Fermentlösung pH 8,50 $\varkappa = 2{,}50 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm

Boratpufferlösung pH 8,50 $\varkappa = 2{,}50 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm

Spannung 240 Volt; Stromstärke 14 mA; Zeit = 7,5 Std.

Tabelle 10.

Lösung	Vol. in ccm	Fermenteinheiten Fumarathydrase relativ	Fumarathydrase absolut	gelbes Ferment relativ	gelbes Ferment absolut
Ausgangslösung	10,0	0,57	5,70	0,45	4,50
U-Stück	27,5	0,182	4,95	0,15	4,13
Zelle 6+	2,0	0,163	0,33	0,10	0,20
Zelle 5+	2,0	0,154	0,31	0,015	0,03
Zelle 4+	2,0	—	+ —	—	+ —
			5,59		4,36
			Verlust 2%		Verlust 3%

Der Versuch ist ohne Wirksamkeitsverlust verlaufen, und führt in Zelle 5 + zu einer allerdings stark verdünnten Lösung mit dem Wirksamkeitsverhältnis 10 : 1 zu Gunsten der Fumarathydrase. 0,9 ccm dieser Lösung ergeben auf Zusatz von 0,5 ccm 40%iger Trichloressigsäure eine außerordentlich schwache Trübung, die im Nephelometer gemessen wird. Da eine Rohfermentlösung 1 : 10 mit dem Trockengewicht 83 mg/ccm zur Erzeugung einer gleich starken Trübung auf das 180 fache verdünnt werden muß, folgt für das Trockengewicht der gereinigten Fermentlösung $g = \frac{83 \cdot 1{,}4}{180} = 0{,}654$ mg/ccm. Zelle 5 + enthält 0,154 Fumarathydraseeinheiten. Für eine Einheit berechnet sich dann ein Trockengewicht von 4,2 mg/ccm, was einer Anreicherung auf etwa das 20 fache dem Rohferment gegenüber entspricht.

Versuch 3 c.

Fermentlösung p_H 8,5 $\varkappa = 3{,}40 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm
Boratpufferlösung p_H 8,58 $\varkappa = 3{,}40 \cdot 10^{-3}$ rez. Ohm
Spannung 200 Volt; Stromstärke 14 mA; Zeit 13 Std.

Tabelle 11.

Lösung	Vol. in ccm	Fermenteinheiten Fumarathydrase relativ	Fumarathydrase absolut	gelbes Ferment relativ	gelbes Ferment absolut
Ausgangslösung	10,0	1,13	11,30	0,90	9,0
U-Stück	27,5	0,37	10,17	0,30	8,25
Zelle 6+	2,0	0,33	0,66	0,29	0,58
Zelle 5+	2,0	0,33	0,66	0,10	0,20
Zelle 4+	2,0	0,21	0,44	0,01	0,02
Zelle 3+	2,0	—	+ —	—	+ —
			11,93		9,05
			kein Verlust		kein Verlust

Versuch 3 c ist eine Wiederholung der vorhergehenden Elektrophorese, jedoch mit konzentrierterer Ausgangslösung und längerer Versuchsdauer. Dadurch wird in Zelle 4 + bei höherer Fumarathydraseaktivität eine noch bessere Verschiebung erhalten. Das Wirksamkeitsverhältnis 20 : 1 zu Gunsten der Fumarathydrase stellt den besten der bisher erreichten Werte dar.

C. Versuche über Aktivator und Coferment der Fumarathydrase.

1. Die Adsorption an Tierkohle.

10 ccm einer Rohfermentlösung 1 : 10 werden etwa eine halbe Stunde bei Eiskühlung mit 0,5 gr Tierkohle gerührt. Durch Absaugen wird die Hauptmenge der Kohle entfernt. Das Filtrat ist eine hellgelbe Lösung, die durch allerfeinste darin suspendierte Kohleteilchen etwas dunkel erscheint. Durch einstündiges Zentrifugieren bei 5000 Touren werden die Partikeln niedergeschlagen. Die Lösung im Zentrifugenglas hat sich in zwei scharf gegeneinander abgesetzte Schichten geteilt, eine obere farblose und eine untere tief gelbe Schicht. Nach dem Umschütteln gelingt es nicht mehr durch Zentrifugieren eine Entmischung herbeizuführen, wohl aber nach erneutem Zusatz von einer Spatelspitze Kohle und einstündigem Zentrifugieren. Die farblose Schicht wird herauspipettiert und auf Fumarathydrasewirksamkeit geprüft. Sie erweist sich in allen Fällen als äußerst schwach wirksam, während in der gelben Schicht eine sehr hohe Aktivität zu beobachten ist. Durch Aufkochen der gelben Schicht und Absaugen vom ausgeschiedenen Eiweiß (Kochsaft 1) oder durch Aufkochen von Rohfermentlösung 1 : 30 (Kochsaft

Tabelle 12.

je Thunbergrohr 0,2 ccm farblose Schicht mit wechselnden Zusätzen von Kochsaft (KS) oder Lactoflavinphosphorsäure (LFP)							
Zusätze	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	Nr. 6	Nr. 7
—	8—9'	12—14'	16—17'	18—20'	18—22'	31—32'	30—40'
0,3 ccm KS Nr. 1	—	—	—	2'	—	—	—
0,2 ccm KS Nr. 2	2'	4'	4'	3—4'	7—8'	14'	8'
0,2 ccm KS Nr. 3	—	—	—	9—10'	—	—	—
1 γ LFP	—	—	—	—	10—12'	20'	15—20'
5 γ LFP	—	—	—	—	—	—	9—10'
10 γ LFP	—	—	—	—	—	—	7'

2) bzw. 1 : 150 (Kochsaft 3) werden für sich unwirksame, stark aktivierende Lösungen erhalten. Wegen der durch die Überreduktion mit Natriumhyposulfit bedingten Fermentschädigungen wurden die Ergebnisse nur an solchen Rohren abgeleitet, die unmittelbar nach der Reduktion mti der Wiederfärbung begannen. Tabelle 12 bringt eine Zusammenstellung der mit verschiedenen Zusätzen erhaltenen Aktivierungen. Die Zahlenwerte bedeuten die Zeit der 10 bis 50%igen Reoxydation von Leukomethylenviolett.

In Kontrollansätzen war festgestellt worden, daß ohne Ferment oder ohne Fumarat, auch in Anwesenheit von Lactoflavinphosphorsäure oder Kochsaft keine Reaktion mit dem Leukofarbstoff eintritt.

2. Versuche zur allgemeinen Lactoflavinaktivierung.

Die folgende Tabelle gibt die an verschiedenen Fermentlösungen beobachteten Effekte wieder. Die Zahlenwerte bedeuten wieder 10 bis 50%tige Reoxydationszeit von Leukomethylenviolett in Minuten.

Tabelle 13.

je Thunbergrohr 0.2 ccm Fermentlösung mit wechselnden Zusätzen an Lactoflavinphosphorsäure (LFP) oder Lactoflavin (LF)				
Fermentlösung	ohne Zusätze	mit 5 γ LFP	mit 10 γ LFP	mit 10 γ LF
Rohferment 1 : 10	1'20"	40"	40"	42"
Macerationssaft	3'30"			
dialysiert	4'	2'30"	2'18"	2'30"
Essigesterautolysate aus Hefe	1'10"			
	1'20"	—	43"	—
Phosphatelution einer Adsorption	4'30"	1'30"	1'30"	—
Restlösung einer	5'	—	2'	2'
Adsorption	6'			
Mit $(NH_4)_2SO_4$ gefällte Lösung	1'54"	—	—	56"
durch Dialyse inaktivierte Lösung	23'	—	—	7'30"
durch Phosphatdialyse geschwächte Lösung	4'25"	—	—	

3. Versuche mit katalytisch reduziertem Farbstoff.

Die benützte Apparatur war nach den Angaben von H. und W. Biltz zusammengestellt[67]). Als Katalysator diente Palladiummohr. Aus der Bürette wurde jeweils 1 ccm der Leukofarbstofflösung in ein kleines Röhrchen abgelassen und mit diesem unter Kohlendioxyd-Atmosphäre in das mit den übrigen Komponenten beschickte Thunbergrohr eingesetzt. Nach dem Evakuieren kam das Rohr kurze Zeit zum Temperaturausgleich in den Thermostaten. Dann schüttelte man um, wobei sich die Lösungen vermischen. Im gleichen Augenblick ist in den Rohren ohne Lactoflavin eine sofortige Wiederfärbung bis Stufe 1, in denen mit Lactoflavin bis Stufe 2 zu beobachten. Ein Vergleich der im katalytischen und im Hyposulfitversuch erhaltenen Werte ist in Tabelle 14 durchgeführt worden.

Tabelle 14.

je Thunbergrohr 0,2 ccm Fermentlösung mit und ohne Zusatz von 10 γ Lactoflavin (LF)

Fermentlösung	katalytischer Versuch		Hyposulfitversuch	
	ohne LF	mit LF	ohne LF	mit LF
Rohferment 1 : 10	1'8"	34"	1'20"	40"
durch Dialyse abgeschwächte Lösung	15'40" 16'15"	3'48"	14'	3'45"

Die spontane Reoxydation muß natürlich bei der Berechnung der Fermentwirksamkeit sinngemäß in Abzug gebracht werden. Es zeigt sich aber dann trotzdem eine starke Beschleunigung der Reaktion in Anwesenheit von Lactoflavin.

4. Hydrierung mit Dihydrolactoflavin.

In dem üblichen Ansatz der Wirksamkeitsbestimmung wurde die Methylenviolettlösung durch eine mit m/5 Phosphatpuffer auf pH 7 gehaltene Lösung von 100 γ Lactoflavin rpo ccm ersetzt. Eine solche Lösung ist etwa 1/5000 molar. (Molgewicht LF = 454) 0,2 ccm einer Rohfermentlösung 1 : 10 benötigen zur vollständigen Reoxydation des Flavins, nach 6 übereinstimmenden Versuchen etwa 60 Sekunden; zur 100%tigen Wiederfärbung eines gleichen Volumens m/5000 Leukomethylenviolett aber etwa 4 Minuten.

5. Spaltung durch saure Ammoniumsulfatfällung.

a) Darstellung der Proteinkomponente.

Die Proteinlösung wird mit geringen Abänderungen der Warburg'schen Vorschrift[23]) durch 3malige Behandlung mit saurem Ammoniumsulfat erhalten. 30 ccm Rohferment 1 : 10 werden unter Eiskühlung mit soviel bei Zimmertemperatur gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt, daß eben eine Trübung aufzutreten beginnt. Dazu sind etwa 30 ccm erforderlich; der Sättigungsgrad mit Ammoniumsulfat beträgt 50%. Dann kühlt man auf -5^0 ab und gibt unter starkem Rühren tropfenweise eine eiskalteMischung von 2 Teilen gesättigter Ammoniumsulfatlösung mit 1 Teil 1n Salzsäure zu, wobei die anfängliche Trübung sich mehr und mehr verstärkt und schließlich in einen dicken Niederschlag übergeht. Nach dem Zusatz von etwa 25 bis 30 ccm dieses Gemisches wird Kongopapier deutlich gebläut. Der Sättigungsgrad beträgt dann ungefähr 55%. Man läßt unter gelegentlichem Umrühren etwa eine halbe Stunde bei -5^0 stehen. (sehr wesentlich!) Danach wird der Niederschlag auf der mit Eiswasser gekühlten Zentrifuge mit 15000 Touren abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wird durch Zusatz von festem Natriumbicarbonat neutralisiert, und zu den Rekombinationsversuchen verwendet. (Restlösung). Der Zentrifugenrückstand wird mit 20 ccm 66%tiger kalt gesättigter Ammoniumsulfatlösung nachgewaschen, nochmals zentrifugiert und in m/5 Phosphatpuffer vom pH 7 auf 28 ccm gelöst. (Proteinlösung A). Nach einmaliger Behandlung mit saurer Ammoniumsulfatlösung ist die Inaktivierung nur geringfügig. Die Fumarathydrasewirksamkeit der Proteinlösung A schwankt zwischen 20 und 40% vom Anfangswert. Die Fällung wird daher unter den gleichen Bedingungen wiederholt, wobei man dem geringeren Volumen der Ausgangslösung entsprechend, den Zusatz der sauren Ammoniumsulfatlösung natürlich etwas geringer bemißt, sodaß die Sättigungskonzentration wieder etwa 55% entspricht. Der Niederschlag wird nach dem Auswaschen auf 25 ccm gelöst (Proteinlösung B). Die Fumarathydraseaktivität beträgt dann nur noch etwa 5% der Rohfermentlösung. Führt man die saure Ammoniumsulfatfällung hierauf zum dritten Mal durch, wobei sich der entstandene Niederschlag fast rückstandslos auf 20 ccm löst, so erhält man ein farbloses, schwach opalescierendes Präparat, in dem nicht mehr als 1% der anfänglichen Fumarathydrasewirksamkeit nachweisbar ist. (Proteinlösung C).

b) Rekombinationsversuche

mit Proteinlösung A. Jeweils 0,2 ccm der Proteinlösung wurden mit 0,4 ccm der Restlösung (RL) oder 10 γ Lactoflavin (LF) bzw. Restlösung und Lactoflavin auf Fumarathydrasewirksamkeit geprüft, unmittelbar nach dem Zusammengeben der Komponenten und mehrere

Stunden später. Die Zahlenwerte der Tabelle 15 geben die Zeiten der 10 bis 50%tigen Reoxydation von Leukomethylenviolett wieder.

Tabelle 15.

Inkubationszeit	ohne Zusätze	0,4 ccm RL	10 γ LF	10 γ LF + 0,4 ccm RL
keine	9'	3'10"	2'50"	—
1 Stunde	6'	1'30"	—	—
3 Stunden	4'46"	—	—	—
20 Stunden	5'	1'15"	2'57"	55"

mit Proteinlösung B. Im folgenden Versuch wurden außerdem Rohfermentkochsaft (KS), Codehydrase I und II (Co I bzw. Co II) und Alloxazin-Adenin-dinucleotid (AADN) auf ihre Aktivierungsfähigkeit geprüft.

Tabelle 16.

je Thunbergrohr 0,2 ccm Proteinlösung B mit wechselnden Zusätzen

Inkubationszeit	ohne Zusatz	0,4 ccm RL	0,4 ccm KS	0,1 ccm AADN	0,4 ccm AADN	0,4 ccm RL + AADN	10 γ LEP	100 γ Co I	0,1 ccm Co II
keine	45'	—	—	—	—	—	—	—	—
3 Stunden	—	—	—	3'	2'30"	—	—	—	—
6 Stunden	—	—	—	2'30"	2'	—	—	—	—
16 Stunden	25—30'	2'24"	4'27"	—	2'7"	2'13"	14'	32'	35'

mit Proteinlösung C. Jeweils 0,2 ccm der Proteinlösung C wurden mit steigenden Mengen Alloxazin-Adenin-dinucleotid von 10^{-4} bis 10 γ versetzt und vor der Wirksamkeitsbestimmung über Nacht zur Einstellung des Gleichgewichtes bei 0° aufbewahrt. Ähnliche Ansätze wurden auch mit 0,1 bis 100 γ Lactoflavin und mit Dinucleotid plus einer konstanten Menge von 25 γ Lactoflavin vorbereitet. Die Konzentration der verwendeten Stammlösung von Alloxazin-Adenin-dinucleotid (Molgewicht des Ba-Salzes 920) wurde durch Vergleich ihres Flavingehaltes mit einer bekannten Lactoflavinlösung im Stufenphotometer bestimmt. 1 ccm der Lösung war 40 γ Lactoflavin (Molgewicht 452) pro ccm äquivalent, und enthielt demnach $\frac{920}{452} \cdot 40 = 80$ γ Alloxazin-Adenin-dinucleotid.

Die Wirksamkeit der zum Spaltungsversuch verwendeten Rohfermentlösung betrug 1'10" für 0,2 ccm (1,0 Einheiten). Da aus ihr 20 ccm Proteinlösung erhalten wurden, die sich maximal auf 1'30" reaktivieren ließen, beträgt die Ausbeute an kupplungsfähigem Protein bei 3 maliger Umfällung ca 50%.

Tabelle 17 zeigt die Größe der Reaktivierung in Abhängigkeit von der Konzentration der Zusätze.

Tabelle 17.

je Thunbergrohr 0,2 ccm Proteinlösung C und 0,1 ccm der entsprechend verdünnten Stammlösungen von AADN ubnd LFP

Menge der Zusätze in γ	AADN	LFP	25 γ LFP + AADN
0,0000	120'	120'	120'
0,0004	65'	—	18'30"
0,0008	43'	—	—
0,004	26'	—	9'30"
0,008	12'	—	4'30"
0,04	5'30"	—	—
0,08	3'45"	—	2'17"
0,1	—	110'	—
0,4	3'15"	—	1'53"
0,5	—	102'	—
0,8	2'32"	—	1'34"
1,0	—	90'	—
4,0	1'50"	—	1'5"
5,0	—	56'	—
8,0	1'30"	—	50"
10,0	—	50'	—
25,0	—	51'	—
50,0	—	53'	—
100,0	—	49'	—

D. Versuche zur Trennung von Fumarathydrase und Succinodehydrase.

1. Versuche am tierischen Gewebe.

Ausgangsmaterial für die Darstellung der Präparate war die Beinmuskulatur von Fröschen oder die Brustmuskulatur von Tauben. Die Tiere wurden unmittelbar von dem Versuch getötet.

a) Gewebepreßsäfte und Suspensionen.

Die zerkleinerte, fein zerschnittene Muskulatur wurde mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen, mit 10 ccm Wasser verrührt

und in Eis-Kochsalzmischung eingefroren. Die Masse ließ sich in gefrorenem Zustand in einem Mörser leicht zerstoßen. Der entstandene Brei wurde kurz zentrifugiert. Die überstehende Lösung war meist leicht getrübt und schwach rosa gefärbt. (Gewebepreßsaft). Der Rückstand wurde in Wasser suspendiert, sodaß 1 ccm der Aufschlämmung 0,5 gr frische Substanz enthielt (Gewebesuspension). Die Prüfung in beiden Testen hatte folgende Ergebnisse:

Tabelle 18.

Präparat	je Thunbergrohr 0,1 ccm der Preßsäfte bezw. 0,2 ccm Suspension Gemessene Zeiten und Mole übertragenen Wasserstoffs Fumaratversuch	 Succinatversuch	Verhältnis F : S
Preßsaft aus Froschmuskel 1	3′ $2{,}7 \cdot 10^{-8}$ Mole	30′ $0{,}83 \cdot 10^{-8}$ Mole	1 : 1,3
Preßsaft aus Froschmuskel 2	2′10″ $3{,}7 \cdot 10^{-8}$ Mole	35′ $0{,}71 \cdot 10^{-8}$ Mole	1,3 : 1
Preßsaft aus Taubenmuskel	3′30″ $2{,}4 \cdot 10^{-8}$ Mole	41′ $0{,}61 \cdot 10^{-8}$ Mole	1 : 1
Gewebesuspension (Froschmuskel)	8′ $1{,}0 \cdot 10^{-8}$ Mole	60′ $0{,}41 \cdot 10^{-8}$ Mole	1,6 : 1
Gewebesuspension (Taubenmuskel)	20″ $24 \cdot 10^{-8}$ Mole	4′20″ $6 \cdot 10^{-8}$ Mole	1 : 1

Ohne Fumarat- bzw. Succinatzusatz ist keine Reaktion wahrnehmbar.

b) Trockenmuskel und Macerationssäfte.

Präparate von getrocknetem Taubenbrustmuskel sind nach der von M. Behrens [68]) gegebenen Vorschrift leicht zu gewinnen. 10 gr frischer Muskel werden in flüssiger Luft eingefroren und möglichst rasch in einen mit Phosphorpentoxyd beschickten Exsikkator gebracht. Man evakuiert mit der Hochvakuumpumpe und erhält nach 24 stündigem Stehenlassen im Eisschrank 2,5 gr Trockenpulver. (kalt getrockneter Muskel). Zu einigen Versuchen wurde auch ein Muskel verwendet, der bei 35° an der Luft getrocknet war. Frische Muskelfasern wurden äußerst fein zerschnitten und auf einer Glasplatte ausgestrichen. Sie trocknen ohne in Fäulnis überzugehen innerhalb weniger Stunden ein. (warm getrockneter Muskel).

Aufschlämmungen von getrocknetem Muskel werden in der Weise bereitet, daß 1 ccm 0,125 gr Trockensubstanz enthält. Sie sind dann in ihrer Wirksamkeit direkt mit den Suspensionen des frischen Gewebes vergleichbar.

Macerationssäfte werden aus Trockenmuskel nach Art der Hefemacerationssäfte gewonnen. Der Trockenmuskel wird zunächst mit eiskaltem Wasser ausgewaschen und abzentrifugiert. Dabei geht wohl

der rote Blutfarbstoff aber keinerlei Fermentwirsamkeit in Lösung. Der Rückstand wird dann einer meist 3stündigen Maceration bei 35° mit einer m/5 sekundären Natriumphosphatlösung unterworfen. Der abzentrifugierte Saft ist noch leicht getrübt und tief gelb gefärbt. Beim Aufkochen gibt er einen dicken Niederschlag von denaturiertem Eiweiß. Sämtliche Präparate mit Ausnahme des Trockenmuskels werden in Aceton-Kohlensäure eingefroren aufbewahrt. Sie sind dann wochenlang unverändert haltbar. Beim Aufbewahren bei 0° verschwindet die Aktivität innerhalb kurzer Zeit vollständig.

Tabelle 19 bringt eine Zusammenstellung der Versuchsergebnisse.

Tabelle 19.

Präparat	je Thunbergrohr 0,2 ccm der Suspensionen oder Macerationssäfte Gemessene Zeiten und Mole übertragenen Wasserstoffs Fumaratversuch	 Succinatversuch	Verhältnis F : S
Suspension aus kalt getrocknetem Muskel (frisch)	55″ $7{,}5 \cdot 10^{-8}$ Mole	15′30″ $1{,}6 \cdot 10^{-8}$ Mole	1,2 : 1
Suspension aus kalt getrocknetem Muskel (14 Tage alt)	2′ $4 \cdot 10^{-8}$ Mole	20′ $1{,}25 \cdot 10^{-8}$ Mole	1 : 1,2
Suspension aus warm getrocknetem Muskel	2′5″ $4 \cdot 10^{-8}$ Mole	19′ $1{,}3 \cdot 10^{-8}$ Mole	1 : 1,3
Suspension aus warm getrocknetem Muskel	1′30″ $5{,}3 \cdot 10^{-8}$ Mole	25′ $1{,}0 \cdot 10^{-8}$ Mole	1,3 : 1
Mac-Saft aus kalt getrocknetem Musk. (ziemlich klar)	10′30″ $0{,}76 \cdot 10^{-8}$ Mole	8 Stunden $0{,}05 \cdot 10^{-8}$ Mole	3,8 : 1
Mac-Saft aus warm getrocknetem Musk. (ziemlich klar)	9′ $0{,}89 \cdot 10^{-8}$ Mole	7 Std. 30′ $0{,}055 \cdot 10^{-8}$ Mole	4 : 1
Mac-Saft aus warm getrocknetem Musk. (etwas trübe)	4′20″ $1{,}85 \cdot 10^{-8}$ Mole	2 Stunden $0{,}21 \cdot 10^{-8}$ Mole	2,2 : 1
Macerationssaft aus kalt getr. Muskel (trübe)	48″ $10 \cdot 10^{-8}$ Mole	34′30″ $0{,}72 \cdot 10^{-8}$ Mole	3,5 : 1
Mac-Saft aus kalt getrocknetem Musk. (stark trübe)	35″ $14 \cdot 10^{-8}$ Mole	19′ $1{,}3 \cdot 10^{-8}$ Mole	2,7 : 1
Mac-Saft aus kalt getrocknetem Musk. (klar zentrifug.)	16—20′ —	12 Stunden —	?
gelöste $(NH_4)_2SO_4$ Fällung eines Macerationssaftes	3′15″ $2{,}5 \cdot 10^{-8}$ Mole	66′ $0{,}38 \cdot 10^{-8}$ Mole	1,7 :

2. Versuche mit lebender und plasmolysierter Hefe.

Die lebenden Zellen bzw. die durch Plasmolyse erhaltenen Zelltrümmer wurden 3 mal auf der Zentrifuge mit eiskaltem Wasser gewaschen und in Wasser aufgeschlämmt, derart daß 1 ccm der Suspension 0,5 gr frischer Hefe entsprach. Die Plasmolyse wurde durchgeführt durch Einfrieren in flüssiger Luft oder durch kurze Behandlung mit Essigester. Eine Zerstörung der Zellen mittels Kochsalz oder Rohrzucker lieferte nur unwirksame Präparate.

Einen Vergleich der Präparate in beiden Testen zeigt Tabelle 20;

Tabelle 20.

Hefepräparate	ccm	Pufferlösung ccm	Substrat ccm	Farbstoff ccm	Zeit
lebende Hefe	0,2	0,8 PP	0,1 Fm	1,0 MV	1'30" 1'45"
	0,2	0,9 PP	–	1,0 MV	3'30" 4'
	0,2	1,45 BP	0,2 Sc	0,25 MB	12'
	0,2	1,65 BP	–	0,25 MB	11'
	0,2	1,45 BP	0,2 Sc	0,25 DPI	7'30" 8'
	0,2	1,65 BP	–	0,25 DPI	3'45"
durch einfrieren plasmolysiert	0,1	0,8 PP	0,1 Fm	1,0 MV	28" 30"
	0,1	0,9 PP	–	1,0 MV	13 Std.
	0,1	1,45 BP	0,2 Sc	0,25 MB	15'
	0,1	1,55 BP	–	0,25 MB	60'
mit Essigester plasmolysiert	0,1	0,8 PP	0,1 Fm	1,0 MV	4' 5'
	0,1	0,9 PP	–	1,0 MV	> 12 Std.
	0,1	1,50 BP	0,2 Sc	0,25 MB	> 10 Std.
	0,1	1,60 BP	–	0,25 MB	> 10 Std.

Abkürzungen: PP = Phosphatpuffer m/5 pH 7.
BP = Boratpuffer m/5 pH 8, 75
Fm = m/10 Kaliumfumarat
Sc = m/10 Natriumsuccinat
MV = Methylenviolett m/5000
MB = Methylenblau m/1000
DPI = Dichlor-phenol-indophenol m/1000.

3. Versuche mit Trockenhefe.

1 gr der verschiedenen Trockenhefearten (kalt getrocknete Hefe, warm getrocknete Hefe, Aceton-Dauerhefe) wurde 3mal mit je 20 ccm eiskaltem Wasser auf der Zentrifuge gewaschen und in Wasser auf 8 ccm aufgeschlämmt. 1 ccm der Suspension entspricht 0,125 gr Trokkenhefe oder 0,5 gr frischer Hefe und ist in seiner Wirksamkeit direkt mit den Werten der vorigen Tabellen vergleichbar.

Tabelle 21.

Hefepräparate	je Thunbergrohr 0,1 ccm Hefeaufschlämmung: Pufferlösung	Substrat	Farbstoff	Zeit	Mole übertragenen Wasserstoffs	F : S
kalt getrocknete Hefe	0,8 PP	0,1 Fm	1,0 MV	30—31"	$15{,}5 \cdot 10^{-8}$	10 : 1
	0,9 PP	—	1,0 MV	> 3 Std.	—	
	1,45 BP	0,2 Sc	0,25 MB	62'	$0{,}4 \cdot 10^{-8}$	
	1,55 BP	—	0,25 MB	> 6 Std.	—	
warm getrocknete Hefe	0,8 PP	0,1 Fm	1,0 MV	9'	$0{,}89 \cdot 10^{-8}$	mindestens 10 : 1
	0,9 PP	—	1,0 MV	> 3 Std.	—	
	1,45 BP	0,2 Sc	0,25 MB	> 12 Std.	—	
	1,55 BP	—	0,25 MB	> 12 Std.	—	
Aceton-Dauer-Hefe	0,8 PP	0,1 Fm	1,0 MV	1'45"	$4{,}6 \cdot 10^{-8}$	23 : 1
	0,9 PP	—	1,0 MV	> 6 Std.	—	
	1,45 BP	0,2 Sc	0,25 MB	8 Std.	$0{,}05 \cdot 10^{-8}$	
	1,55 BP	—	0,25 MB	> 24 Std.	—	

4. Versuche mit gereinigten Fermentlösungen.

Gewöhnliches gelbes Rohferment und das aus Essigesterautolysaten dargestellte Trockenpräparat (siehe Seite 40) wurden auf ihr Fumarat-Succinatverhältnis geprüft. Ferner wurde an einer Rohfermentlösung die saure Ammoniumsulfatspaltung durchgeführt und das FS-Verhältnis vor und nach der Rekombination mit Alloxazin-Adenin-dinucleotid festgestellt.

Tabelle 22.

Fermentpräparate	ccm	Pufferlösung	Substrat	Farbstoff	Zeit	Mole übertragenen Wasserstoffs	F : S
gewöhnl. Rohferment 1 : 10	0,2	0,7 PP	0,1 Fm	1,0 MV	1'10"	$6{,}9 \cdot 10^{-8}$	10 : 1
	0,2	0,8 PP	—	1,0 MV	∞	—	
	0,4	1,15 BP	0,3 Sc	0,25 MB	1 St. 15'	$0{,}34 \cdot 10^{-8}$	
	0,4	1,35 BP	—	0,25 MB	> 5 St.	—	
Rohferm. aus Essigesterautolysaten	0,2	0,7 PP	0,1 Fm	1,0 MV	1'40"	$4{,}8 \cdot 10^{-8}$	27 : 1
	0,2	0,8 PP	—	1,0 MV	∞	—	
	0,4	1,15 BP	0,2 Sc	0,25 MB	4 St. 30'	$0{,}09 \cdot 10^{-8}$	
	0,4	1,25 BP	—	0,25 MB	∞	—	
Proteinlösung A	0,2	0,7 PP	0,1 Fm	1,0 MV	2'56"	$2{,}7 \cdot 10^{-8}$	32 : 1
	0,2	0,8 PP	—	1,0 MV	∞	—	
	0,6	0,95 BP	0,2 Sc	0,25 MB	6 St. 30'	$0{,}064 \cdot 10^{-8}$	
	0,6	1,15 BP	—	0,25 MB	> 12 Std.	—	
Proteinlösung A + 5 γ AADN	0,2	0,7 PP	0,1 Fm	1,0 MV	1'	$8{,}0 \cdot 10^{-8}$	80 : 1
	0,2	0,8 PP	—	1,0 MV	∞	—	
	0,6	0,95 BP	0,2 Sc	0,25 MB	5 St. 30'	$0{,}076 \cdot 10^{-8}$	
	0,6	1,15 BP	—	0,25 MB	> 12 Std.	—	

5. Versuche mit pflanzlichen Extrakten.

Die pflanzlichen Materialien wurden, soweit sie trocken waren, fein zermahlen, in frischem Zustand zerrieben und mit 0,1%iger sekundärer Natriumphosphatlösung aufgeschlämmt (5 ccm pro 1 g). Sie blieben dann meist etwa eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur stehen, in einigen Fällen wurden sie auch längere Zeit bei 37° geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren waren die Lösungen stets noch trübe. Sie wurden, falls auch ohne Zusatz von Fumarsäure eine Wiederfärbung von Methylenviolett zu beobachten war, zur Entfernung von Akzeptoren 12 Stunden gegen stehendes dest. Wasser bei 3—5° dialysiert. Die Ergebnisse der Versuche sind aus Tabelle 23 ersichtlich, wobei zum Vergleich die Wirksamkeiten von Rohferment und Hefemacerationssaft angegeben sind.

Tabelle 23.

Fermentpräparate	Fumarat-Einheiten
Rohferment 1 : 10	1,00
Macerationssaft aus Hefe 1 : 3,5	0,33
Bohnen 1 : 5 kalt extrahiert	0,12
Bohnen 1 : 5 bei 35° geschüttelt	0,17
Roßkastanien 1 : 5 getrocknet	0,06
Roßkastanien 1 : 5 frisch	0,04
Mais 1 : 5 trocken	0,02
Gerste 1 : 5 trocken	—
Roggen 1 : 5	—
Weizen: 1 : 5 trocken	—
Hanf 1 : 5 trocken	0,09
Kartoffeln 1 : 5 frisch	—
gelbe Hirse 1 : 5 trocken	0,02
Erbsen 1 : 5 kalt extrahiert	0,12
Erbsen 1 :5 bei 37° geschüttelt	0,24
Sporen von Bovista nigrescens	—
Lactarius vellereus (trocken)	0,25?
Lactarius deliciosus (trocken)	0,06
Boletus edulis (frisch)	—

Die Entfärbung von 0.5 ccm m/1000 Methylenblau durch 0,5 ccm der Extrakte war in Anwesenheit von Succinat bei Erbsen und Bohnen meist nach 3 Stunden vollendet. Nur bei Lactarius vellereus wurde eine Entfärbungszeit von 30 Minuten mit und ohne Succinat gemessen.

6. Versuche mit Fumarathydrase freiem Flavinenzym.

Das absolut Fumarathydrase freie Flavinenzympräparat hatte im Methylenblauversuch eine Wirksamkeit von 1,0 Einheiten. Als Succinodehydrasepräparate dienten frischer und kalt getrockneter Taubenbrustmuskel. Das p_H der Ansätze war durch Zugabe von Phosphatpuffer auf 7 eingestellt worden. 0,1 ccm Natrium-Fumarat wurden als Substrat zugegeben. In den Kontrollrohren ohne Substrat war in keinem Fall eine Wiederfärbung zu beobachten.

Tabelle 24.

je Thunbergrohr 1,0 ccm m/5000 Lactoflavin (LF) oder 1,0 ccm m/5000 Methylenviolett oder 3,0 ccm gelbes Ferment			
Fermentpräparate	100%ige Reoxydation von Lactoflavin	10—50%ige Reoxydation von Leuko-MV	vollständige Färbung von Leukoflavinenzym
0,04 g frischer Muskel	16—20'	ca. 30"	keine
0,01 g getrockneter Muskel	30—40'	1'30"	keine

Literaturverzeichnis.

1. F. G. Fischer und O. Wiedemann, Ann. *513*, 260 (1934). Ann. *520*, 52 (1935). Ann. *522*, 1 (1936).
2. F. G. Fischer und H. Eysenbach, Ann. *529*, 87 (1937).
3. F. G. Fischer und H. Eysenbach, Ann. *530*, 99 (1937).
4. A. Szent-Györgyi und Mitarbeiter, Z. physiol. chem. *236*, 1 (1935).
5. O. Warburg und W. Christian, Biochem. Z. *266*, 377 (1933).
6. E. Adler, G. Günther und H. Evereth, Z. physiol. chem. *255*, 29 (1938).
7. H. Theorell, Biochem. Z. *278*, 263, (1935).
8. F. Weygand und H. Stocker, Z. physiol. chem. *247*, 167 (1937).
9. R. Willstätter und H. Kraut, B. *56*, 1118 (1923). B. *57*, 1088 (1923).
10. W. Robertson, Dissertation Freiburg i. Br. 1937.
11. H. Theorell, Biochem. Z. *285*, 207 (1936).
12. O. Meyerhoff und W. Möhle, Biochem. Z. *294*, 249 (1937).
13. Tiselius, Henschen und Svensson, Biochemical J. *32*, 1919 (1938).
14. G. Agren und E. Hammarsten, Enzymologia *4*, 13, (1937).
15. H. Theorell, Biochem. Z. *275*, 1 (1934).
16. H. Theorell, Naturwiss. *22*, 289 (1934).
17. H. Theorell, Biochem. Z. *275*, 344 (1935).
18. O. Warburg, W. Christian und Griese, Biochem. Z. *297*, 417, (1938).
19. P. Karrer, P. Frei, B. H. Ringier und H. Bendas, Helv. chim. acta *21*, 826 (1938).
20. R. Kuhn und H. Rudy, B. *69*, 2557 (1936).
21. Th. Wagner-Jauregg, Enzymfschg. *4*, 333 (1935).
22. R. Kuhn und P. Boulanger, B. *69*, 1557 (1936).
23. O. Warburg und W. Christian, Biochem. Z. 298, 150 (1938).
24. E. G. Ball, Science *88*, 131, (1938).
25. E. Haas, Biochem. Z. *298*, 378 (1938).
26. P. Ohlmeyer, Biochem. Z. *297*, 66 (1938).
27. H. Albers, E. Beyer, A. Bohnenkamp und G. Müller, B. *71*, 1913 (1938).
28. O. Warburg und W. Christian, Biochem. Z. *298*, 368, (1938).
29. J. G. Dewan und D. E. Green, Biochem. J. *31*, 1074 (1937).
30. Th. Wagner-Jauregg und H. Ruska, B. *67*, 1298 (1933).
31. Th. Wagner-Jauregg, H. Rauen und F. Möller, Z. physiol. chem. *224*, 67 (1934). Z. physiol. chem. *225*, 145 (1934).
32. H. Laser, Biochem. Z. *268*, 451, (1934).
33. E. Adler und H. v. Euler, Z. physiol. chem. *225*, 41 (1934).
34. J. H. Quastel und M. D. Whetham, Biochem. J. *18*, 519 (1924).
35. H. Borsook und H. Schott, J. Biol. Chem. *92*, 535 (1931).
36. J. H. Quastel, Biochem. J. *29*, 1983, (1935).
37. F. Ogston und D. Green, Biochem. J. *29*, 1983, (1935).
38. H. Wieland und R. Sonderhoff, Ann. 499, 213, (1932).

59. R. Sonderhoff und M. Deffner, Ann. *525*, 132, (1936).
40. T. Thunberg, Arch. f. exp. Zellfschg. *19*, 238 (1937).
41. H. Wieland.
42. K. Laki, Z. physiol. chem. 236, 31, (1934).
43. J. H. Quastell und Wooldridge, Biochem. J. *21*, 148 (1926).
44. R. Nilsson und F. Alm, Z. physiol. chem. *239*, 179 (1936).
45. T. Thunberg, Rev. Biol. *5*, 318 (1930).
46. T. Thunberg, Arch. int. physiol *18*, 601 (1922).
47. K. Laki, Z. physiol. chem. *249*, 61 (1937).
48. I. Banga, Z. physiol. chem. *249*, 205 (1937).
49. H. v. Euler, E. Adler und T. Steenhoff-Eriksen, Z. physiol. chem. *248*, 227 (1937).
50. K. Laki, Z. physiol. chem. *254*, 27 (1938).
51. F. G. Hopkins, E. J. Morgan und C. Lutwack-Mann, Biochem. J. *32*, 1877 (1938).
52. H. v. Euler und H. Hellström, Z. physiol. chem. *255*, 159 (1938).
53. H. v. Euler und G. Günther, Naturwiss. *26*, 676 (1938).
54. J. G. Dewan und D. E. Green, Biochem. J. *32*, 626 (1938).
55. H. Theorell, Biochem. Z. *288*, 317 (1936).
56. D. E. Green und J. G. Dewan, Biochem. J. *32*. 1200 (1938).
57. A. Szent-Györgyi, B. *72*, 53 (1939) Abtlg. A.
58. K. Laki, Z. physiol. chem. *254*, 25 (1938).
59. T. Wagner-Jauregg und H. Rauen, Z. physiol. chem. *233*, 215 (1935).
60. H. v. Euler, H. Albers und F. Schlenk, Z. physiol. chem. *240;* 113 (1936).
61. O. Warburg und W. Christian, Biochem. Z. *242*, 216 (1931).
62. O. Warburg und W. Christian, Biochem. Z. *254*, 439 (1932).
63. R. Robinson und Morgan, Biochem. J. *22*, 1277 (1928).
64. C. Neuberg, Biochem. Z. *88*, 432 (1918).
65. W. Pauli, Biochem. Z. *152*, 355 (1924).
66. H. Theorell, Biochem. Z. *278*, 291 (1935).
67. H. und W. Blitz, Ausführung quantitativer Analysen.
68. M. Behrens, Z. physiol. chem. *209*, 59 (1932).

Lebenslauf.

Am 2. Oktober 1910 wurde ich, Alfred Roedig, als Sohn des Bezirksdirektors Christian Roedig und seiner Ehefrau Johanna, geb. Albers, in Düsseldorf geboren.

Ich besuchte seit Ostern 1917 die Vorschule in Düsseldorf und nach einer Versetzung meines Vaters im Jahre 1919 die Volksschule und die Oberrealschule in Karlsruhe in Baden. Nach einer weiteren Versetzung meines Vaters war ich von 1922 an Schüler des Reformrealgymnasiums Köln, Humboldstr. 41, dessen Besuch ich in den Jahren 1925 bis 1928 wegen Krankheit unterbrechen mußte. Nachdem ich Ostern 1931 an dieser Anstalt die Reifeprüfung bestanden hatte, immatrikulierte ich mich im Sommersemester 1931 an der Universität Bonn und ab Wintersemester 1931/32 an der Universität Freiburg im Breisgau als Student der Naturwissenschaften. Seit dem Sommersemester 1933 widmete ich mich insbesondere dem Studium der Chemie. Im April 1935 legte ich an der Universität Freiburg das erste und im Dezember 1936 das zweite Verbandsexamen ab. Durch die Berufung meines Lehrers, Professor F. G. Fischer, kam ich im Oktober 1937 nach Würzburg, wo ich am chemischen Institut der Universität seit 1. Dezember 1937 als Hilfskraft für das Medizinerpraktikum tätig bin.